

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR - PPGBM

Ocorrência, diversidade e efeitos evolutivos do endossimbionte *Wolbachia*  
(Anaplasmataceae) em espécies neotropicais de *Drosophila* do subgrupo  
*willistoni*

MÁRIO JOSIAS MÜLLER

Tese de Doutorado submetida ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Biologia Molecular da  
UFRGS como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutor em  
Ciências.

Orientadora: Prof. Dra. Vera Lúcia da Silva Valente

Coorientador: Prof. Dr. Victor Hugo Valiati

Porto Alegre, abril de 2013.

Este trabalho foi realizado no laboratório de *Drosophila* do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS e no laboratório de Biologia Molecular da Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS, com o auxílio de recursos do CNPq.

Dedico esta tese a toda  
minha família, em especial a  
minha querida Fernanda.

## AGRADECIMENTOS

O trabalho científico não se diferencia das demais atividades humanas. Como elas, ele é uma construção social! Esta tese é o resultado de quatro anos de intensas trocas sociais. Assim tenho muito a agradecer, primeiramente aos coautores deste trabalho que contribuíram de forma fundamental na elaboração dos projetos, no trabalho de bancada e nas discussões dos manuscritos. São eles:

Minha querida orientadora Dra. Vera Valente, pela coragem em mais uma vez inovar aceitando orientar este estudo com *Wolbachia/Drosophila*. Por ter me estimulado a coletar na Amazônia, pela orientação e disponibilidade na revisão da tese. Fiquei encantado com *Drosophila* e agora também sou “descendente” do Prof. Cordeiro.

Meu amigo e coorientador o Dr. Victor Hugo Valiati, com quem tudo isso começou! Obrigado pelo acompanhamento incansável ao longo de todos estes anos. É uma honra ser seu colaborador.

A Dra. Maríndia Deprá, pela parceria, ensinamentos e ajuda com o *Dot Blot*;

Aos biólogos Carine von Mühlen, Natália Dörr e Felipe Benites os quais tive o privilégio de co-orientar na iniciação científica;

Ao Dr. Hermes Schmitz, nosso excelente taxonomista e um grande amigo.

Também quero agradecer aos meus antigos colegas de laboratório de *Drosophila*, Lizandra Robe, Adriana Sassi e Juliana Cordeiro. Saudades!

Aos atuais colegas de laboratório, Carolina Flores Garcia, Juliana Gonçalves, Rebeca Zanini, Georgia, Lucas, Paula e Brenda (UFRGS) e Janete, Angelo Scherer, Munique Mendonça, Michele, Cristian, Carol, Lusia, Fernanda Zardo, Débora Gasperin e Luis Fernando Medina (UNISINOS);

Aos funcionários do Laboratório de *Drosophila*, Bibiana, Dani e Berê pelo grande auxílio.

Aos amigos Igor Radamés de Oliveira e Guilherme Cauduro.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Ao secretário do PPG Elmo Cardoso, um amigo, competente profissional e grande colorado!

A toda a minha família, em especialmente à minha esposa Fernanda, meu pai Mário, minha mãe Judith, meu irmão Márcio e meus sogros Miriam e Amaro.

*Os próprios cientistas passam um bom tempo perguntando-se se este ou aquele enunciado tem “verdadeiramente” relação com um objeto “exterior”, se ele não é um produto da imaginação ou um artefato, resultado dos procedimentos utilizados. É por isso que não se pode dizer que os homens de ciência ocupam-se dos temas científicos deixando aos filósofos os debates entre realismo e relativismo. (Latour e Woolgar 1997:196)*

## SUMÁRIO

Abreviaturas, símbolos e unidades.....	7
Resumo .....	8
Abstract.....	9
CAPÍTULO 1 .....	10
I – Introdução	
O endossimbionte <i>Wolbachia</i> .....	10
Métodos de detecção e caracterização molecular.....	13
Efeitos fenotípicos e implicações evolutivas em <i>Drosophila</i> .....	14
O subgrupo da <i>Drosophila willistoni</i> .....	16
Endossimbiontes em espécies do subgrupo <i>willistoni</i> .....	17
II - Objetivos.....	20
CAPÍTULO 2 .....	21
<i>Wolbachia pipientis</i> is associated with different mitochondrial haplotypes in natural populations of <i>Drosophila willistoni</i>	
CAPÍTULO 3 .....	26
Reevaluating the infection status by the <i>Wolbachia</i> endosymbiont in <i>Drosophila</i> Neotropical species from the <i>willistoni</i> subgroup	
CAPÍTULO 4 .....	56
Complexa evolução mitocondrial no subgrupo da <i>Drosophila willistoni</i> : evidência de introgressão e implicações para DNA <i>barcoding</i>	
CAPÍTULO 5 .....	75
III – Discussão e conclusões.....	75
Perspectivas .....	78
Referências Bibliográficas.....	79

### Abreviaturas, símbolos e unidades.

bp	pares de base
DNA	ácido desoxirribonucleico
<i>COI</i>	<i>citocromo oxidase subunidade I</i>
<i>kl-3</i>	<i>male fertility factor</i>
<i>wsp</i>	<i>Wolbachia surface protein</i>
kb	kilobases
pb	pares de base
µg	micrograma
µl	microlitro
mM	milimolar
min	minuto
s	segundos
ng	nanograma
U	unidade
PCR	reação de polimerização em cadeia
<i>P</i>	probabilidade
<i>Hd</i>	diversidade haplotípica
$\pi$	diversidade nucleotídica
<i>DP</i>	desvio padrão
<i>D</i>	teste de neutralidade de Tajima
<i>F</i>	teste de neutralidade de Fu

## Resumo

*Wolbachia* é uma  $\alpha$ -proteobactéria da família Anaplasmataceae que vive em simbiose no interior de células de invertebrados, a maioria delas espécies de insetos. Em espécies de *Drosophila*, *Wolbachia* pode causar dois fenótipos de parasitismo reprodutivo, incompatibilidade citoplasmática e a morte do macho, além de outros fenótipos que afetam o *fitness* do hospedeiro. São estratégias usadas pelo endossimbionte para aumentar sua frequência na população da espécie hospedeira as quais podem ter consequências evolutivas para a mitocôndria, que com ela é co-herdada e para o fluxo gênico. O subgrupo *willistoni*, pertencente ao subgênero *Sophophora*, é um conjunto de espécies crípticas, neotropicais e filogeneticamente relacionadas. Este subgrupo é formado pelas espécies *Drosophila willistoni*, *Drosophila paulistorum*, *Drosophila equinoxialis*, *Drosophila tropicalis*, *Drosophila insularis* e *D. pavlovskiana*. As relações evolutivas entre estas espécies são bem resolvidas em filogenias moleculares usando genes nucleares, porém as reconstruções com marcadores mitocondriais mostram incongruências que refletem uma diferente história evolutiva do genoma mitocondrial. *Screenings* usando principalmente linhagens de laboratório encontraram *Wolbachia* em *D. willistoni*, *D. tropicalis* e *D. paulistorum*. Em *D. willistoni* e *D. tropicalis* foi encontrada uma variante de *Wolbachia* denominada *wWil*, enquanto que na superespécie *D. paulistorum*, foram encontradas diferentes linhagens de *Wolbachia* em diferentes semiespécies do complexo. Contudo, pouco se sabe sobre a ocorrência, diversidade e efeitos evolutivos em populações naturais. Este estudo tem como objetivo contribuir para o conhecimento da relação de *Wolbachia* com espécies do subgrupo da *Drosophila willistoni*. Varreduras foram realizadas com PCR diagnóstica e *Dot-blot* tanto em amostras de populações naturais quanto em linhagens de laboratório. Os resultados iniciais usando somente PCR mostraram 55% da amostra de *D. willistoni*, coletada no bioma Mata Atlântica no sul do Brasil, infectada por *Wolbachia*. Também foi constatado que o endossimbionte estava associado a diferentes haplótipos mitocondriais o que sugere infecção por transmissão horizontal. Não foi encontrada evidência que *Wolbachia* diminuiu a diversidade mitocondrial nesta espécie. Já nas amostras diagnosticadas com PCR e *Dot-blot*, todas as linhagens de *D. willistoni*, *D. paulistorum*, *D. equinoxialis*, mostraram sinal de infecção no *Dot-blot*, porém a maioria delas falhou na amplificação do gene *wsp* (*Wolbachia Surface Protein*). Isto sugere diferentes níveis de infecção, tanto intraespecíficos quanto interespecíficos. Desta situação, a técnica de *Dot-blot* é mais adequada para a detecção de *Wolbachia* do que a PCR padrão. Em *D. willistoni*, a infecção *wWil* foi detectada tanto em amostras do sul quanto do norte do Brasil, mostrando uma infecção de proporções continentais. Em *D. tropicalis* foi caracterizada a infecção *wAu*, de *D. simulans*. Pela primeira vez foi encontrada *D. equinoxialis* abrigoando *Wolbachia*, sendo que a variante detectada é relacionada a *wMel* de *D. melanogaster*. Uma linhagem de laboratório de *D. paulistorum* Amazônica também mostrou estar infectada por uma variante *wMel*. Com isso, há evidências de transmissão horizontal de variantes de *Wolbachia* entre espécies de *Drosophila* do velho mundo e neotropicais. O sequenciamento de região 5' do gene *COI* (*Citocromo Oxidase Subunidade I*), mostrou um complexo padrão de variação no *mtDNA* no subgrupo *willistoni*. Foi encontrado um haplótipo compartilhado entre *D. willistoni* e *D. insularis*, o que constitui evidência de introgressão. Associação com *Wolbachia* pode ter levado a diminuição da diversidade haplotípica em *D. equinoxialis*. Devido à complexa evolução mitocondrial, as distâncias genéticas de *COI* não separam corretamente as espécies. O gene nuclear *kl-3* é sugerido como um DNA *Barcoding* para a identificação molecular destas espécies.



## Abstract

*Wolbachia* is an  $\alpha$ -proteobacterium from the Anaplasmataceae family, and lives in symbiosis inside invertebrate cells, mostly from insect species. In *Drosophila* species, *Wolbachia* may cause two reproductive parasitism phenotypes: cytoplasmic incompatibility and male killing, besides some other phenotypes that can affect the host fitness. These phenotypes are strategies employed by the endosymbiont in order to increase its own frequency in the host population, which can cause evolutionary consequences for the mitochondria, since the bacterium is co-inherited with it, and for the gene flow. The *willistoni* subgroup, belonging to the *Sophophora* subgenus, is a group of cryptic Neotropical species, which are all phylogenetically related. This subgroup is formed by the species *Drosophila willistoni*, *Drosophila paulistorum*, *Drosophila equinoxialis*, *Drosophila tropicalis*, *Drosophila insularis* and *D. pavlovskiana*. The evolutionary relationships between these species are well resolved in molecular phylogenies when using nuclear genes. On the other hand, reconstructions using mitochondrial markers show incongruences that reflect a different evolutionary history of the mitochondrial genome. Screenings mainly using laboratory lines found *Wolbachia* infection in *D. willistoni*, *D. tropicalis* and *D. paulistorum*. In *D. willistoni* and *D. tropicalis* it was found a *Wolbachia* variant called *w*Wil, while in the superspecies *D. paulistorum* were found different *Wolbachia* lines according to each semispecies from the complex. However, little is known about the occurrence, diversity and evolutionary effects of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. This study aims to contribute to the knowledge regarding the relationships of this endosymbiont with species from the *Drosophila willistoni* subgroup. Screenings were performed with diagnostic PCR and Dot-blot either in samples from natural populations and also from laboratory lines. Initial results using PCR only showed that 55% of the *D. willistoni* sample, collected in the Atlantic Forest biome in southern Brazil, was infected with *Wolbachia*. It was also found that the endosymbiont was associated to different mitochondrial haplotypes, suggesting an infection by horizontal transmission. We did not find any evidence suggesting that *Wolbachia* decreased the mitochondrial diversity in this species. In the samples diagnosed with PCR and Dot-blot, all lines of *D. willistoni*, *D. paulistorum* and *D. equinoxialis* showed sign of infection in the Dot-blot, however, most of them failed in the *wsp* (*Wolbachia Surface Protein*) gene amplification. This suggests different levels of infection, either intra and interspecific. Therefore, we assume that the Dot-blot technique is more suitable for *Wolbachia* detection than standard PCR. In *D. willistoni*, the *w*Wil infection was detected either in samples from the South and the North of Brazil, showing an infection with continental proportions. In *D. tropicalis* it was characterized the *w*Au infection, originally from *D. simulans*. For the first time it was found *D. equinoxialis* to be hosting *Wolbachia*, and the variant found is related to *w*Mel from *D. melanogaster*. A laboratory line of *D. paulistorum* Amazonian also showed to be infected with a *w*Mel variant, so there is evidence of horizontal transmission of *Wolbachia* variants between Old World and Neotropic *Drosophila* species. Sequencing of the 5' region from the *COI* (*Citocromo Oxidase Subunidade I*) gene showed a complex pattern of variation in the *mtDNA* from the *willistoni* subgroup. It was found a haplotype shared between *D. willistoni* and *D. insularis*, which constitutes evidence for introgression. Association with *Wolbachia* may have led a decrease in the haplotype diversity in *D. equinoxialis*. Due to a complex mitochondrial evolution, the *COI* genetic distances do not correctly separate the species. The nuclear gene *kl-3* is suggested as a DNA barcoding to the molecular identification of these species.

# CAPÍTULO 1

## I – INTRODUÇÃO

### O endossimbionte *Wolbachia*

Endossimbiontes são organismos que vivem internamente nos tecidos ou em células especializadas de um hospedeiro em uma relação de simbiose. *Wolbachia* é uma bactéria gram-negativa, da classe das  $\alpha$ -proteobactérias, ordem Rickettsiales, pertencente à família Anaplasmataceae. É um endossimbionte intracelular obrigatório, encontrada principalmente nos tecidos reprodutivos de seus hospedeiros, bem como em tecidos somáticos (Dobson *et al.*, 1999). Esta bactéria foi encontrada primeiramente nos ovários de mosquitos da espécie *Culex pipiens* por Hertig & Wolbach em 1924, sendo posteriormente denominada *Wolbachia pipientis* (Hertig, 1936). Nas últimas décadas foi constatada como sendo uma infecção amplamente disseminada entre os artrópodes e nematóides filariais. Em estudos empíricos, foram encontradas 20% das espécies de insetos (Jeyaprakash & Hoy, 2000; Werren & Windsor, 2000), 61% das espécies de isópodes terrestres (Bouchon *et al.*, 2008) e 90% das espécies de nematóides filariais infectadas por este endossimbionte (Bandi *et al.*, 1998). Estima-se por meta-análise que 66% das espécies de artrópodes estejam infectadas por *Wolbachia* (Hilgenboecker *et al.*, 2008).

Em filogenias moleculares usando sequências do gene 16S rRNA, *Wolbachia* tem se mostrado monofilética em relação a outras Rickettsiales (Breeuwer *et al.*, 1992; O'Neill *et al.*, 1992; Stouthamer *et al.*, 1993). Apesar de ser considerada como uma única espécie, *W. pipientes*, uma alta diversidade molecular é observada e assim não refletida em seu *status* taxonômico (Casiraghi *et al.*, 2007). Sem uma descrição formal de novas espécies de *Wolbachia*, os principais ramos da filogenia foram denominados de supergrupos. Atualmente, *Wolbachia* é dividida nos supergrupos A, B, C, D, E, F, H, I, J e K. (Ros *et al.*, 2009). Foi proposto um supergrupo G, baseado numa linhagem isolada de algumas espécies de aranhas australianas (Rowley *et al.*, 2004), porém esta mostrou ser o resultado de recombinação do 16S rRNA entre os supergrupos A e B (Baldo & Werren, 2007). Nos supergrupos A e B estão inclusas a maioria das linhagens de *Wolbachia* encontradas em artrópodes (Werren *et al.*, 1995b), enquanto C e D

contêm as em nematoides filariais (Bandi *et al.*, 1998). O Supergrupo E consiste em *Wolbachia* de insetos Colêmbolos (Vandekerckhove *et al.*, 1999; Czarnetzki & Tebbe, 2004). Linhagens do supergrupo F foram encontradas em várias ordens de insetos, em escorpiões e nematoides (Baldo *et al.*, 2007; Ros *et al.*, 2009; Keiser *et al.*, 2008; Ferri *et al.*, 2011). As do supergrupo H infectam algumas espécies de isópteros (Bordenstein & Rosengaus, 2005). Os supergrupos I e J foram registrados em insetos Siphonaptera e nematoides da ordem Spirurida, respectivamente. No supergrupo K estão linhagens que infectam ácaros.

Ao contrário dos outros endossimbiontes de Anaplasmataceae, *Wolbachia* evoluiu estratégias para maximizar sua transmissão vertical (Anderson & Karr, 2001), sendo transmitida como uma herança uniparental materna via citoplasma do oócito. Contudo, há indícios da ocorrência de transmissão horizontal entre espécies de diferentes táxons. A transmissão vertical não dá suporte para explicar o número de espécies e táxons infectados pela bactéria, visto que é possível encontrar incongruências nos resultados entre filogenia da bactéria e de seu hospedeiro. Os resultados do trabalho de Casiraghi *et al.* (2005) apontam para a transferência horizontal de linhagens de *Wolbachia* de artrópodes para nematódeos ou vice-versa mais do que uma vez. Panaram & Marshall (2007) encontraram a linhagem do supergrupo F (característica de nematoides filárias) em insetos ortópteros, indicando a ocorrência de transmissão horizontal entre clados filogeneticamente distantes. Há também evidências indiretas da transmissão horizontal entre parasitóides e seus hospedeiros insetos (Werren *et al.*, 1995a). Experimentos de laboratório já demonstraram a transferência horizontal de *Wolbachia* entre ácaros não parasitas e *Drosophila* (Rozhok *et al.*, 2011). Recentemente foi documentada a transmissão horizontal no canibalismo e predação entre isópodes terrestres (Le Clec'h *et al.*, 2013).

Dentre as estratégias adotadas por *Wolbachia* para maximizar sua transmissão vertical se destacam as que envolvem a manipulação do sistema reprodutivo do hospedeiro. Este fenômeno é comumente chamado de parasitismo reprodutivo. Dentre as alterações reprodutivas induzidas por *Wolbachia* estão a feminização (Rousset *et al.*, 1992), a partenogênese (Stouthamer *et al.*, 1993), a morte do macho (O'Neill *et al.*, 1997) e a incompatibilidade citoplasmática (IC) (O'Neill & Karr, 1990; Clancy & Hoffmann, 1996).

A conversão de machos genéticos em fêmeas, feminização, é talvez a mais evidente estratégia para uma bactéria herdada maternalmente como *Wolbachia*, uma vez

que o espermatozóide não transmite fatores citoplasmáticos como a mitocôndria e *Wolbachia* e assim a transformação de machos em fêmeas dobra o potencial de transmissão do endossimbionte para a próxima geração (Clark, 2007).

Outra forma de dobrar sua probabilidade de transmissão à prole é manipulando a partenogênese de espécies com sistema haplodiplóide. *Wolbachia* interfere na oogênese de modo a evitar a redução do número cromossômico à metade ou ainda revertendo o núcleo haplóide a condição diplóide (Gottlieb *et al.*, 2002). Assim os óvulos não fertilizados, que originalmente se desenvolveriam em machos, na condição diplóide se desenvolvem em fêmeas.

Já a morte do macho infectado é um fenótipo que se estabelece apenas quando beneficia a fêmea infectada em termos de sobrevivência e fecundidade. Do ponto de vista genético, matar os machos evita o cruzamento entre irmãos (Werren, 1997), enquanto que em termos ecológicos diminui o número de competidores em populações com elevada disputa por recursos (Clark, 2007).

A IC se manifesta quando o esperma de um macho infectado fertiliza o óvulo de uma fêmea não infectada ou infectada com uma linhagem diferente de *Wolbachia*, levando ao aumento da mortalidade de embriões (Hoffmann & Turelli, 1988). Todas as outras combinações de cruzamento são compatíveis. Assim sendo, fêmeas infectadas podem ser fertilizadas pelo esperma de machos não infectados ou infectados com a mesma linhagem de *Wolbachia*, o que lhes confere vantagem em termos de disponibilidade de parceiros (Hoffmann & Turelli, 1997). Desta forma, fêmeas infectadas podem produzir um elevado número médio de prole aumentando a frequência de *Wolbachia* a cada geração (Sinkins, 2004). Contudo, *Wolbachia* não chega a ser fixada na população, já que o cruzamento de machos infectados com fêmeas não infectadas, reduz significativamente o sucesso reprodutivo de ambos (Crespigny & Wedell, 2007).

*Wolbachia* também pode causar outras alterações em seus hospedeiros, como, por exemplo, influenciar sua longevidade, alterar interações hospedeiro-parasitóide ou ainda, quando da sua remoção de determinadas espécies, inibir o desenvolvimento ovariano (Clark, 2007).

## Métodos de detecção e caracterização molecular

Com o advento de métodos baseados em biologia molecular, a detecção e identificação de linhagens de *Wolbachia* em diferentes espécies de invertebrados foi objeto de estudo de um número crescente de trabalhos na última década.

Zhou *et al.* (1998) clonaram e seqüenciaram o gene de cópia única *wsp* (*Wolbachia surface protein*), que codifica uma proteína de superfície de membrana, em 28 linhagens de *Wolbachia*. A seqüência deste gene é altamente variável e pode ser usada para a identificação de diferentes linhagens de *Wolbachia*. Baseados nas seqüências deste gene os autores propuseram que *Wolbachia pipientis* pode ser inicialmente dividida em doze subgrupos, oito do grupo A e quatro do grupo B. Também determinaram um método para classificação de *Wolbachia* utilizando-se de grupos específicos de oligonucleotídeos de *wsp* por PCR, que permitem isolar tipos de *Wolbachia* sem a necessidade de clonar e seqüenciar genes individuais. A comparação das seqüências do gene *wsp* amplificadas por PCR, mostrou que os grupos divergem em 23%, o que é quase dez vezes maior que a divergência encontrada nas seqüências do 16S rDNA de *Wolbachia* (O' Neill *et al.*, 1992; Rousset *et al.*, 1992). Desta forma, além da amplificação do gene 16SrDNA, a PCR de segmentos do gene *wsp* tem sido amplamente usada para a detecção de *Wolbachia* e sua seqüência utilizada na determinação das linhagens e na recuperação das relações evolutivas entre elas.

Contudo, a detecção de *Wolbachia* por PCR padrão pode gerar falso negativo, devido talvez pela interferência do DNA do hospedeiro (Jeyaprakash & Hoy, 2000) ou ainda quando o endossimbionte se encontra em baixa quantidade nos tecidos (Miller *et al.*, 2010). Assim o uso de métodos alternativos mais sensíveis para o diagnóstico de infecção por *Wolbachia* se torna necessário. *Dot-blot* (Bourtzis *et al.*, 1996), *Long PCR* (Jeyaprakash & Hoy, 2000), *Real-time PCR* (Simoncini *et al.*, 2001), *Southern blot* (Miller & Riegler, 2006), *Nested PCR* (Sun *et al.*, 2007), *screening* baseado em microscopia de imunofluorescência (Casper-Lindley *et al.*, 2011) e qPCR/HRM (*High Resolution Melting*) (Lee *et al.*, 2012) tem sido empregados.

O uso de seqüências do gene *wsp* tem sido questionado tanto para a reconstrução filogenética quanto para a diferenciação das linhagens de *Wolbachia*. No caso de filogenias, o gene está sujeito a recombinação genética homóloga (Werren & Bartos, 2001) a qual pode confundir as interpretações da evolução da bactéria (Jiggins *et al.*, 2001).

Estudos mais recentes têm demonstrado que, apesar de apresentar uma porção hipervariável e de evolução rápida, diferentes linhagens de *Wolbachia* podem mostrar a mesma sequência de *wsp* (Miller & Riegler, 2006). Assim, este marcador não é adequado para discriminar linhagens proximamente relacionadas. Riegler *et al.* (2005) verificaram a presença de repetições em tandem (VNTR – *Variable Number Tandem Repeats*) no genoma anotado da linhagem de *Wolbachia* encontrada em *Drosophila melanogaster* (*wMel*), as quais puderam ser utilizadas para uma diferenciação mais apurada entre linhagens. A utilização de *primers* flanqueadores desta região (VNTR-141) resulta em fragmentos de tamanhos diferentes para cada linhagem de *Wolbachia*, de acordo com o número de repetições, facilitando a diferenciação de linhagens pela simples comparação do tamanho dos amplicons revelados em gel de agarose sobre luz ultravioleta.

Além dessas regiões genômicas destaca-se o *Multilocus Sequence Typing System* (MLST) desenvolvido por Baldo *et al.* (2007) através da utilização de cinco genes conservados (*gatB*, *coxA*, *hcpA*, *fbpA* e *ftsZ* (Holden *et al.*, 1993) e o *wsp* sendo usado como marcador adicional. A partir do método de multilocos (MLST), estabeleceu-se uma central padronizada para armazenamento de informações em forma de banco de dados (*Wolbachia* MLST Databases - <http://pubmlst.org/wolbachia/>) (Jolley *et al.*, 2004), com a finalidade de comparar dados e realizar análises filogenéticas.

### Efeitos fenotípicos e implicações evolutivas em *Drosophila*

Em *Drosophila*, *Wolbachia* induz dois fenótipos de parasitismo reprodutivo: a incompatibilidade citoplasmática (IC) e a morte do macho (Riegler & O'Neill, 2004).

É bem claro o potencial do fenótipo de IC em causar isolamento reprodutivo, que pode ser unidirecional ou bidirecional. Um exemplo de isolamento unidirecional promovido por *Wolbachia* ocorre em duas espécies irmãs, *Drosophila recens* e *Drosophila subquinaria*. A primeira é infectada por *Wolbachia*, enquanto a segunda não. O cruzamento entre fêmeas de *D. recens* e machos de *D. subquinaria* é inibido por isolamento comportamental, enquanto que no cruzamento recíproco poucos híbridos viáveis são obtidos. Entretanto, quando *Drosophila recens* tem *Wolbachia* removida pelo tratamento com antibióticos, híbridos viáveis entre fêmeas de *D. subquinaria* e machos de *D. recens* são produzidos indicando que incompatibilidade citoplasmática ocorre neste sentido. Assim neste caso, a infecção por *Wolbachia* funciona como uma

barreira assimétrica pós-zigótica que é complementada pelo isolamento comportamental que é pré-zigótico no outro sentido (Shoemaker *et al.*, 1999).

O isolamento bidirecional ocorre quando duas populações são fixadas com dois tipos incompatíveis de *Wolbachia*, com completa penetrância (Clark, 2007). Com isso, *Wolbachia* sozinha pode estabelecer um completo isolamento reprodutivo, podendo assim levar ao início de um processo de especiação. Este tipo de especiação é chamado de especiação infecciosa e foi recentemente reportado para as semiespécies do complexo da *Drosophila paulistorum*, onde o endossimbionte promove tanto isolamento sexual quanto incompatibilidade citoplasmática bidirecional (Miller *et al.*, 2010).

Outra consequência do ponto de vista evolutivo causada pela infecção por *Wolbachia*, diz respeito à evolução da mitocôndria. Como o endossimbionte e a mitocôndria são co-herdados, o aumento da frequência de *Wolbachia* na população do hospedeiro levará também ao aumento da mitocôndria associada. Um haplótipo em *Drosophila melanogaster* associado à infecção wMel tem experimentado este aumento na frequência (Nunes *et al.*, 2008). Deste modo, pode haver diminuição da diversidade mitocondrial como um efeito da infecção por *Wolbachia* como verificado em *Drosophila recens* em relação a *D. subquinaria* (Shoemaker *et al.*, 2004).

Além dos fenótipos de parasitismo reprodutivo, outros fenótipos vêm sendo reportados em *Drosophila*. Weeks *et al.* (2007), mostraram que após 20 anos de infecção por *Wolbachia* em populações de *Drosophila simulans* da Califórnia, a fecundidade relativa de fêmeas infectadas, que no início da infecção era de 15% a 20% menor que a de fêmeas não infectadas, agora aumentou em média de 10% na comparação com fêmeas livres de *Wolbachia*. Isto demonstra que a relação ecológica entre *Wolbachia* e *Drosophila* pode evoluir rapidamente para uma associação mais mutualista.

Em determinadas condições, a infecção por *Wolbachia* pode trazer vantagens imediatas ao hospedeiro. Um exemplo disso é o efeito antiviral que *Wolbachia* proporciona em indivíduos de *Drosophila melanogaster*, independente do background genético destes, frente à contaminação com diferentes vírus de RNA, patógenos que induzem rápida mortalidade quando injetados em adultos (Hedges *et al.*, 2008).

Por fim foram registradas alterações na locomoção e olfato de indivíduos de *D. melanogaster* e *D. simulans* infectados com *Wolbachia* (Peng *et al.*, 2008). Não foram encontradas preferências significantes em *Drosophila melanogaster* e *D. simulans* em

relação a escolha de parceiros associada à infecção por *Wolbachia* (Crespigny & Wedell, 2007).

#### O subgrupo da *Drosophila willistoni*

O subgrupo críptico da *Drosophila willistoni*, pertencente ao subgênero *Sophophora*, consiste de um “cluster” de espécies e subespécies de moscas neotropicais altamente relacionadas evolutivamente, muitas das quais foram definidas pela presença ou ausência de híbridos férteis em cruzamentos realizados entre linhagens de laboratório (Burla *et al.*, 1949; Dobzhansky *et al.*, 1957; Dobzhansky & Powell, 1975; Ehrman & Powell, 1982; Cordeiro & Winge, 1995). Seis espécies formam este subgrupo: *Drosophila willistoni* Sturtevant, 1916, *Drosophila equinoxialis* Dobzhansky, 1946, *Drosophila paulistorum* Dobzhansky & Pavan em Burla *et al.*, 1949, *Drosophila tropicalis* Burla & Da Cunha em Burla *et al.*, 1949, *Drosophila insularis* Dobzhansky em Dobzhansky *et al.*, 1957 e *Drosophila pavlovskiana* Kastritsis & Dobzhansky, 1967.

Embora morfologicamente similares do ponto de vista externo, estas espécies mostram diferenças na morfologia da genitália dos machos (Burla *et al.*, 1949; Malagolowkin, 1952, Spassky, 1957; Winge & Cordeiro, 1963) e na forma das espermatecas das fêmeas (Sturtevant, 1921; Patterson & Mainland, 1944; Spieth, 1949). Além destes caracteres morfológicos, as espécies deste subgrupo exibem também diferenças no padrão de bandeamento de seus cromossomos politênicos (Dobzhansky *et al.*, 1950; Kastritsis & Dobzhansky, 1967; Rohde *et al.*, 2006), no som de corte produzido pelos machos durante a corte sexual por Ritchie & Gleason (1995) e ao nível molecular, variação em aloenzimas (Ayala & Powell, 1972; Ayala *et al.*, 1972; Garcia *et al.*, 2006) e em sequências de DNA (Gleason *et al.*, 1998; Robe *et al.*, 2010).

O subgrupo *willistoni* inclui espécies com ampla distribuição geográfica e mesmo espécies extremamente restritas. *D. willistoni* é a espécie com maior distribuição geográfica, ocorrendo do México Central e Flórida – EUA, ao norte, passando pela América Central e Caribe seguindo pela América do Sul até o norte da Argentina e o Uruguai. *D. paulistorum* é a segunda espécie com maior distribuição, indo da Guatemala e Trinidad até o sul do Brasil. *D. equinoxialis* está distribuída do México Central e Caribe até o nordeste do Brasil, enquanto que a área de abrangência de *D. tropicalis* vai do sul do México e Caribe até o centro e nordeste do Brasil. *D. insularis* e *D. pavlovskiana* são endêmicas de ilhas nas Antilhas e Guianas, respectivamente.



Dentre estas espécies destaca-se *D. paulistorum* com *status* de superespécie, ou seja, um complexo formado por semiespécies ou raças geográficas que exibem pronunciado isolamento reprodutivo entre si. Em seu trabalho clássico de 1959, Dobzhansky as chamou de espécies *in status nascendi* (Dobzhansky & Spassky, 1959). São elas: Amazônica, Andino-Brasileira, Centro-Americana, Orinocana, Transicional e Interior, sendo esta última descrita mais tarde (Pérez-Salas *et al.*, 1970).

As relações evolutivas entre estas espécies e semiespécies do subgrupo *willistoni* inferidas a partir de genes mitocondriais, mostram incongruências quando comparadas as reconstruções filogenéticas usando genes nucleares (Gleason *et al.*, 1998; Robe *et al.*, 2010). Como as árvores de genes não necessariamente são iguais à árvore das espécies, essas incongruências refletem diferentes histórias evolutivas dos genomas mitocondrial e nuclear. Robe *et al.* (2010) propõe que as discordâncias dos marcadores mitocondriais em relação aos nucleares ocorrem devido a eventos de introgressão assimétrica da mitocôndria entre as espécies do subgrupo. Fêmeas híbridas férteis poderiam retrocruzar com machos da espécie paterna, transmitindo a mitocôndria da espécie materna. Assim a mitocôndria da espécie materna entraria na espécie paterna e poderia ainda ser mantida por um efeito carona com o endossimbionte *Wolbachia* (Robe *et al.*, 2010).

Dada está evidência indireta de introgressão, tornam-se necessários estudos que avaliem a diversidade mitocondrial em populações naturais e possíveis efeitos da associação com endossimbiontes.

#### Endossimbiontes em espécies do subgrupo *willistoni*

*Screenings* realizados na última década detectaram *Wolbachia* em linhagens pertencentes a três espécies do subgrupo *willistoni*.

Miller & Riegler (2006) encontraram linhagens de *D. willistoni*, provenientes de populações da América do Sul e América Central, infectadas por *Wolbachia* e sugeriram que esta infecção estaria fixada nas populações continentais. Contudo, não detectaram a infecção em linhagens coletadas antes da década de 1970 assumindo assim que a infecção em *D. willistoni* é recente. Do ponto de vista filogenético, a linhagem de *Wolbachia* encontrada em *D. willistoni* é proximamente relacionada à linhagem *wAu* de *Drosophila simulans*, diferindo desta no tamanho do VNTR-141 e no padrão de distribuição no embrião. Com base nestas diferenças, essa *Wolbachia* foi considerada

uma nova linhagem denominada *w*Wil. Tanto *w*Wil em *D. willistoni*, quanto *w*Au em *D. simulans* não induzem níveis mensuráveis de IC.

A infecção em linhagens de *D. tropicalis*, também foi atribuída a variante *w*Wil de *D. willistoni* (Mateos *et al.*, 2006), porém foi detectada com marcadores de 16S rDNA e *wsp*, os quais não são capazes de discriminar entre *w*Wil e *w*Au.

A história de micróbios parasitas reprodutivos em *D. paulistorum* é bem mais antiga. Os trabalhos de inviabilidade dos híbridos e esterilidade dos machos nas semiespécies de *D. paulistorum* (Ehrman, 1968; Ehrman *et al.*, 1972; Ehrman & Ramos, 1973; Ehrman *et al.*, 1995) levaram a ideia de infecção por microrganismos semelhantes a *Mycoplasma* (*mycoplasma-like microorganisms*). Estas bactérias intracelulares estariam em uma relação de equilíbrio em cada uma das semiespécies de *D. paulistorum*, porém nos híbridos intersemiespécies esse equilíbrio seria rompido levando a uma alta letalidade embrionária e esterilidade dos machos, aonde o número destes micróbios nos órgãos reprodutivos é elevado.

Em um capítulo recente desta história, Miller *et al.* (2010) identificaram como sendo *Wolbachia* as infecções nas semiespécies de *D. paulistorum* previamente designadas como bactérias *mycoplasma-like*. Todas as seis semiespécies estão infectadas com o endossimbionte, sendo que pelo menos quatro semiespécies abrigam linhagens específicas de *Wolbachia* (Orinocana, Transicional, Centro-Americana e Amazônica). Os autores descobriram, usando a técnica de imunohistoquímica e microscopia de epifluorescência, que *Wolbachia* aumenta sua replicação nos híbridos intersemiespécies, causando assim a inviabilidade embrionária e esterilidade dos machos. Também executaram experimentos de “cura” com antibióticos e cruzamentos, onde verificaram que *Wolbachia* induz isolamento tanto pré-zigótico quanto pós-zigótico entre as semiespécies de *D. paulistorum*. Assim, concluíram que *Wolbachia* coevoluiu com seus hospedeiros no complexo da *D. paulistorum* tornando-se um mutualista obrigatório, mas que nos híbridos torna-se patogênica.

Outro endoparasita reprodutivo registrado é *Spiroplasma*, encontrada em duas populações de laboratório de *D. willistoni* causando o fenótipo de morte dos machos (Ebbert, 1991).

Linhagens de *D. equinoxialis* e *D. insularis* foram testadas para *Wolbachia* e deram negativas para a infecção, sendo que, até o momento, a ocorrência de *Wolbachia* nestas espécies não foi detectada (Miller & Riegler, 2006; Mateos *et al.*, 2006).

A maior parte das amostras usadas nos trabalhos citados é constituída por linhagens de laboratório. É necessário também executar varreduras em busca de endoparasitas em amostras provenientes de populações naturais destas espécies. Neste sentido, nosso estudo vem preenchendo esta lacuna no conhecimento da ocorrência de *Wolbachia* e possíveis efeitos sobre a evolução mitocondrial no subgrupo da *Drosophila willistoni*.

## II – OBJETIVO GERAL

Esta tese tem como objetivo geral o estudo do sistema *Wolbachia/Drosophila* em populações naturais de espécies neotropicais do subgrupo *willistoni* de *Drosophila*, no intuito de ampliar o conhecimento sobre a ocorrência e diversidade do endossimbionte *Wolbachia* nestas espécies, bem como avaliar possíveis efeitos desta associação sobre a evolução mitocondrial no subgrupo da *Drosophila willistoni*.

Objetivos específicos:

1. Testar a utilidade do método de DNA *Barcoding* na identificação das espécies crípticas de *Drosophila* do subgrupo *willistoni*;
2. Diagnosticar a infecção por *Wolbachia* com técnicas de biologia molecular em indivíduos e isolinhagens de espécies do subgrupo *willistoni*;
3. Caracterizar molecularmente as linhagens de *Wolbachia*;
4. Verificar possíveis efeitos sobre a diversidade genética mitocondrial das populações.

## CAPÍTULO 2

### **WOLBACHIA PIPIENTIS IS ASSOCIATED WITH DIFFERENT HAPLOTYPES IN NATURAL POPULATIONS OF DROSOPHILA WILLISTONI**

**Mário Josias Müller<sup>a</sup>, Carine von Mühlen<sup>b</sup>, Victor Hugo Valiati<sup>b,c</sup> and Vera Lúcia da Silva Valente<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Laboratório de Drosophila, Departamento de Genética, Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM), Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Laboratório de Biologia Molecular, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), São Leopoldo, RS, Brazil.

<sup>c</sup> Programa de Pós Graduação em Biologia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), São Leopoldo, RS, Brazil.

*Short communication* publicado no **JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY** número 109, ano 2012, páginas 152-155.



## Short Communication

## *Wolbachia pipientis* is associated with different mitochondrial haplotypes in natural populations of *Drosophila willistoni*

Mário Josias Müller<sup>a,\*</sup>, Carine von Mühlen<sup>b</sup>, Victor Hugo Valiati<sup>b,c</sup>, Vera Lúcia da Silva Valente<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de *Drosophila*, Departamento de Genética, Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM), Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Biologia Molecular, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), São Leopoldo, RS, Brazil

<sup>c</sup>Programa de Pós Graduação em Biologia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), São Leopoldo, RS, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 15 June 2011

Accepted 30 August 2011

Available online 12 September 2011

## Keywords:

*Wolbachia*

*Drosophila willistoni*

Infection prevalence

Haplotype diversity

Cytochrome Oxidase I

## ABSTRACT

The prevalence of the endosymbiont *Wolbachia pipientis* and its effects on mitochondrial genetic diversity were analyzed in natural populations of *Drosophila willistoni*, a neotropical species recently infected. Total infection rate was 55% and no evidence was found that the *Wolbachia* infection decreased the diversity of mtDNA. *Wolbachia* was seen to be associated with different mitochondria, suggesting multiple horizontal transmission events and/or transmission paternal leakage of mitochondrial and/or *Wolbachia*. These hypotheses are evaluated in the context of the present study and other research.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

*Wolbachia pipientis* is an intracellular symbiont bacterium responsible for one of the major infections in invertebrates, affecting arthropods and filarial nematodes. Empirical studies have estimated that 20% of insect species are infected (Werren et al., 1995a; Werren and Windsor, 2000), though meta-analyses have estimated the number as high as 66% (Hilgenboecker et al., 2008). This endosymbiont is predominantly transmitted as a maternal inheritance. Horizontal transfer (HT) also occurs, and most evidence currently available is based on the phylogenies of *Wolbachia* strains that nevertheless are incongruent with the relationships recovered for host species (O'Neill et al., 1992; Rousset et al., 1992; Werren et al., 1995b).

In *Drosophila*, *Wolbachia* may cause cytoplasmic incompatibility (CI) and death of males (Riegler and O'Neill, 2004), which leads to sex ratio distortions. CI induction increases the frequency of infected females in host populations (Riegler and O'Neill, 2007). The ecological relationship *Wolbachia* has with hosts may initiate with parasitism, rapidly progressing into mutualism (Riegler et al., 2005; Weeks et al., 2007). However, under certain conditions *Wolbachia* may bring fitness benefits to the host (Dean, 2006; Hedges et al., 2008).

An example of a recent *Wolbachia* infection is the neotropical species *Drosophila willistoni*, belonging to a cluster of six cryptic species called *willistoni* subgroup. *D. willistoni* is the most widely distributed species of the cluster, spreading from northern Argentina to southern USA (Florida) and Mexico (reviewed in Ehrman and Powell, 1982; Cordeiro and Winge, 1995). *D. willistoni* lines collected before the 1970s were not infected by *Wolbachia*, though all continental lines, ranging from Mexico to Uruguay collected in the 1990s and thereafter harbor a *Wolbachia* strain called wWil, related to the wAu strain detected in *Drosophila simulans* (Ballard, 2004; Miller and Riegler, 2006).

Since *Wolbachia* is co-inherited with mitochondria, natural selection acting over the bacterium will also affect mitochondria. Depending on the infection context, this hitchhiking effect may increase or decrease mitochondrial genetic diversity (Keller et al., 2004; Dean et al., 2003; Shoemaker et al., 2003). In a comparative analysis of 12 *Drosophila* mitochondrial genomes, Montooth et al. (2009) revealed that the molecular evolutionary pattern is purifying selection. Therefore, a positive selection could be the effect of the association with endosymbionts. In this sense, the study of *Wolbachia* dynamics in recently infected populations represents an excellent opportunity to estimate infection prevalence and to assess effects on mtDNA evolution in host species populations.

Here, *Wolbachia* infection prevalence is evaluated in natural *D. willistoni* populations of the Atlantic Forest biome, southern Brazil. The effect of the infection on mitochondrial haplotypic diversity is also assessed.

\* Corresponding author. Address: Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, Porto Alegre CEP 91501-970, RS, Brazil. Fax: +55 51 3308 7311.

E-mail address: [josias\\_bio@yahoo.com.br](mailto:josias_bio@yahoo.com.br) (M.J. Müller).

**Table 1**

Location, number of *Drosophila willistoni* individuals with different *Wolbachia* infection status, *Cytochrome Oxidase Subunit I (COI)* haplotypes, haplotype and nucleotide diversity indexes and infection prevalence.

Location	N	Infected individuals	mtDNA haplotypes	Uninfected individuals	mtDNA haplotypes	Haplotype diversity ( <i>H<sub>d</sub></i> )	Nucleotide diversity ( $\pi$ )	Infection rate (%)
Pontal do Paraná (1)	10	3	1, 4	7	1, 12	0.511	0.00089	30
Guaratuba (2)	9	6	1, 9	3	10, 11	0.583	0.00281	66.6
Laguna (3)	8	6	1, 9	2	9, 14	0.464	0.00181	75
Maracajá (4)	11	3	1	8	1	–	–	27.3
Torres (5)	9	4	1, 5, 7, 8	5	1, 4, 6	0.833	0.00259	44.4
Osório (6)	10	8	1, 2, 3, 4, 13	2	1	0.756	0.00142	80
São João do Polêsine (7) <sup>a</sup>	3	3	15	0	–	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	100
Total	60	33	10	27	8	0.700	0.00204	55

N = specimen number.

The numbers in brackets correspond to the collection sites labeled in the map shown in Fig. 1.

<sup>a</sup> Excluded from molecular diversity analysis due to small sample size.

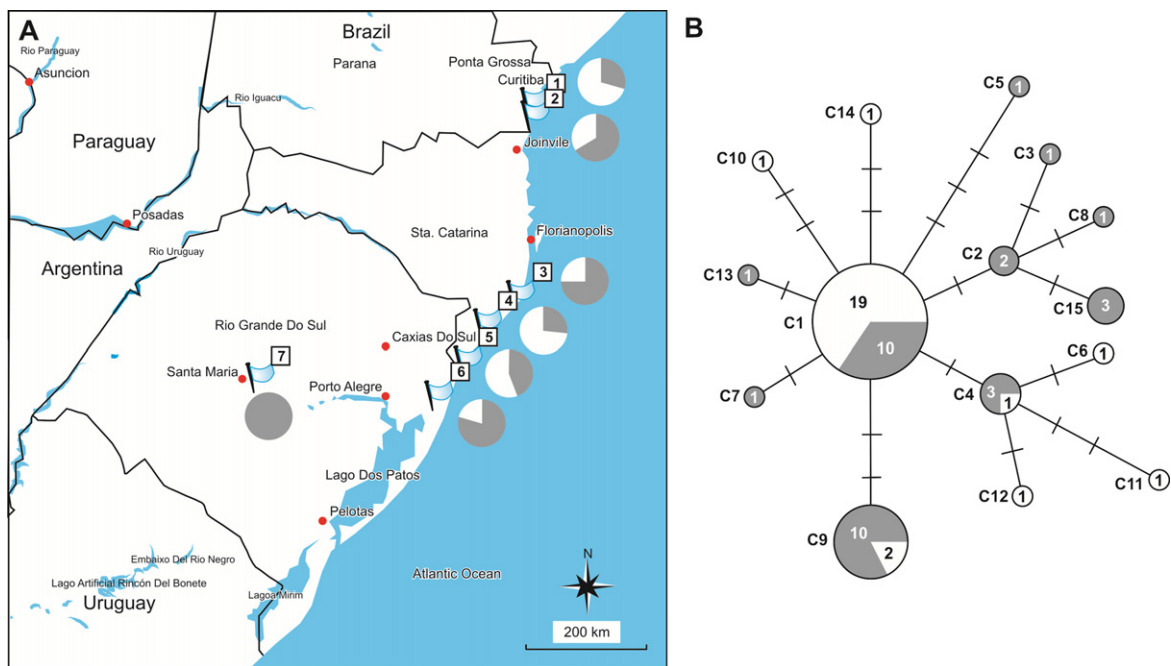
Specimens were collected in April 2010 at seven Atlantic Forest sites corresponding to the municipalities São João do Polêsine (29°39'08.94"S, 53°31'43.74"W), Osório (29°53'08.20"S, 50°16'39.81"W), and Torres (29°22'33.3"S, 49°45'69.2"W), (in the state of Rio Grande do Sul), Maracajá (28°50'16.5" S, 49°24'45.6"W) and Laguna (28° 24'56.0"S, 48°47'47.0"W), (state of Santa Catarina) and Guaratuba (25°51'12.4"S, 48° 33'73.8"W) and Pontal do Paraná (25°33'33.2"S, 48°33'27.0"W), (state of Paraná).

Genomic DNA was extracted from one single fly according to the non-phenolic protocol by Gloor et al. (1993). PCR reactions were run in a 25- $\mu$ L volume using 1  $\mu$ L of the DNA to amplify *Cytochrome Oxidase I (COI)* and 2  $\mu$ L for *Wolbachia Surface Protein (wsp)*, with 12.5  $\mu$ L of the PCR Master Mix 2X (Fermentas, Lithuania) (0.05 U/ $\mu$ L *Taq* DNA polymerase, 10X buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM of each dNTP), 1  $\mu$ L of each primer (20  $\mu$ M each) and ultrapure water to the final volume. The primers used were TY-J-1460 5'-TACAATCTATCGCTAAACTTCAGCC-3' and C1-N-2329 5'-ACT-GTAAATATATGATGAGCTCA-3' (Simon et al., 1994) to amplify an

approximately 950-bp fragment of the mitochondrial gene *COI*. Temperature cycles were: 5 min 95 °C, 35 cycles of 94 °C for 40 s, 55 °C for 40 s and 72 °C for 1 min, then 72 °C for 3 min.

PCR screening for *Wolbachia* infection was conducted using the primers Wsp-F 5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAACTAGCTA-3' and Wsp-R 5'-AAAAATTAACGCTACTCCAGCTTCTGCAC-3' (Jeyaprakash and Hoy, 2000), which amplify an approximately 600 bp fragment of the gene *wsp*. Cycling conditions were 95 °C for 2 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, then 72 °C for 5 min. A negative (ultrapure water) and a positive control (*Drosophila melanogaster* Oregon line that is infected by *Wolbachia*) were included in both reactions. PCR products were electrophoresed on agarose gels 1% stained with ethidium bromide and visualized under UV transillumination.

Amplicons were submitted to purification and direct sequencing in Macrogen (Macrogen Inc., Seoul, Korea). Each sample was sequenced from both directions. Quality of the chromatogram was evaluated using the Chromas Pro 1.5 software (<http://www.technelysium.com.au>). Sequence identity was obtained by comparison of



**Fig. 1.** (A) Map showing location of collection sites of *Drosophila willistoni* specimens. Flags indicate the GPS points (coordinates given in the text). Number next to flags indicate the name of the site as given in Table 1. The pie charts next to each dot indicate the proportion of the sample that was infected (gray) and uninfected (white) with *Wolbachia* and (B) median-joining network of mtDNA (*COI*) *Drosophila willistoni* haplotypes. Circles represent different haplotypes; diameters are proportional to haplotype frequency; number of individuals is indicated in circles. *Wolbachia* infected individuals (gray); uninfected individuals (white). Bars in the branches refer to number of mutation steps.

similarity values to the sequences deposited in GenBank using the BLASTn program (NCBI, available online). Sequence alignment was carried out using the ClustalW tool, Mega 5 software (Tamura et al., 2011) and edited with the BioEdit software (Hall, 1999). Consensus sequences were analyzed using the DnaSP 5.19 software (Librado and Rozas, 2009) to calculate nucleotide and haplotype diversity. Molecular analysis of variance (AMOVA) and neutrality tests were calculated using the Arlequin software (Schneider et al., 1999). An intraspecific phylogeny of COI haplotypes was inferred using the network algorithm median-joining in the Network program (Bandelt et al., 1999).

In the alignment of 60 partial COI sequences were observed 19 polymorphic sites along 751 bases, all corresponding to silent mutations, resulting in the formation of 15 mitochondrial haplotypes (for GenBank accession numbers see Supplementary material). Table 1 shows the number of *D. willistoni* specimens from each location analyzed, the COI haplotypes, genetic diversity estimates and *Wolbachia* infection status.

Of the 60 individuals tested, 33 (55%) were positive and 27 (45%) were negative for *Wolbachia* infection. Infection frequencies varied between populations but there was no discernible geographical pattern (Fig. 1A). The partial sequence of the *wsp* gene was identical in 33 amplicons, corresponding to the sequence observed in strains wWil and wAu.

This finding differs from the observations by Miller and Riegler (2006), who suggested that *Wolbachia* would be fixed in continental *D. willistoni* populations. Nevertheless, it should be stressed that samples analyzed by those authors were composed mostly by laboratory strains. As previously described for *D. melanogaster*, there is polymorphism for infection rates in natural populations (Hoffmann et al., 1994).

The relationship between mitochondrial haplotypes and the association with *Wolbachia* is shown in Fig. 1B. Haplotype C1 is ancestor of the other haplotypes, is the most frequent total, and is shared across all samples (except for the sample collected in São João do Polêsine). *Wolbachia* was observed to be associated to 10 of the 15 mitochondrial haplotypes generated. Yet, haplotypes C1, C4 and C9 were detected in both infected and uninfected individuals. The chi-square analysis showed no statistical difference between infected and uninfected in C1 and C4 haplotypes. However, statistically significant difference was found for haplotype C9 ( $P < 0.02$ ). This haplotype was the most frequent in places where it was sampled (Guaratuba and Laguna) and this may be related to this deviation to a greater number of infected.

The highest haplotype diversity was found in the Torres sample, while the lowest was seen in the Laguna sample. AMOVA revealed that 70.63% of variation occurs within populations and 39.98% between populations. The star network arrangement, with several rare haplotypes (C3, C5, C6, C7, C8, C10, C11, C12, C13 and C14) and the low nucleotide diversity indicate populational expansion (Mirol et al., 2008). Analyses of neutrality tests of Tajima  $D$  ( $-1.82193$ ,  $P < 0.05$ ) and Fu and Li  $F$  ( $-3.52798$ ,  $P < 0.02$ ), also support this scenario. In this sense, the unimodal pattern of the Mismatch distribution curve (data not shown), together with sum of squares (0.0212) and Raggedness index (0.1644) do not afford to rule out this hypothesis ( $P = 0.38$ ).

There are no clear signs that *Wolbachia* infection decreased mtDNA diversity in these natural *D. willistoni* populations. The Osório sample showed an infection prevalence of 80%, and is the sample with the second highest haplotype diversity ( $Hd = 0.756$ ). As for the sample with the lowest *Wolbachia* prevalence, only one haplotype was observed. The effect of *Wolbachia* on mitochondrial genetic diversity may be weak due to the fact that (i) infection is recent, (ii) reproductive parasitism occurs at low levels or is absent and (iii) *Wolbachia* is associated to different mitochondria.

The association of *Wolbachia* to different mitochondria may be the result of an ancient vertical transmission carrying divergent COI nucleotide sequences. However, in this scenario the divergence in the *wsp* should also be expected. Since infection in *D. willistoni* is recent, a finding confirmed by the lack of polymorphism in the *wsp* marker (Miller and Riegler, 2006), multiple HT events and/or paternal leakage of mitochondrial and/or *Wolbachia* may explain the association of *Wolbachia* to different mitochondrial haplotypes. *D. willistoni* was infected by HT with wAu-like variant probably donated by species of the American Neotropical *saltans* group. (Miller and Riegler, 2006). The occurrence of another HT event should not be ruled out. The hypothesis of paternal leakage of mitochondrial (Sherengul et al., 2006) does not seem robust enough to explain the shuffling of *Wolbachia* and mitochondrial lineages, due to the fact that no peak competition was observed in the chromatogram of direct COI sequencing, which may suggest heteroplasma. On the other hand the occurrence of paternal leakage of *Wolbachia* is possible, despite being a rare phenomenon in *Drosophila* (Serbus et al., 2008). The search for *Wolbachia* in parasitoids associated to neotropical drosophilid assemblages may reveal which species are potential HT vectors possibly involved in the continental scale infection of *D. willistoni*.

## Acknowledgments

This study was funded by fellowships and grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul/FAPERGS PRONEX (10/0028-7), and Universidade do Vale do Rio dos Sinos/UNISINOS. The authors are grateful to Dr. Wolfgang Müller (Medical University of Vienna) for helpful suggestions, Msc. Carolina Flores Garcia (UFRGS) for the discussion, laboratory operators Igor Radamés de Oliveira (UNISINOS) and Bibiana C. Macedo (UFRGS) for the technical support provided, Nicolas Gompel who kindly gave the image of *Drosophila willistoni* to the graphical abstract and anonymous referees for the careful analysis of the manuscript.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jip.2011.08.011.

## References

- Ballard, J.W.O., 2004. Sequential evolution of a symbiont inferred from the host: *Wolbachia* and *Drosophila simulans*. *Mol. Biol. Evol.* 21, 428–442.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Rohl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16, 37–48.
- Cordeiro, A.R., Winge, H., 1995. Levels of Evolutionary Divergence of *Drosophila willistoni* Sibling Species. In: Levine, L. (Ed.), *Genetics of Natural Populations. The Continuing Importance of Theodosius Dobzhansky*. Columbia University Press, New York, pp. 262–280.
- Dean, M.D., Ballard, K.J., Glass, A., Ballard, J.W.O., 2003. Influence of two *Wolbachia* strains on population structure of east African *Drosophila simulans*. *Genetics* 165, 1959–1969.
- Dean, M.D., 2006. A *Wolbachia*-associated fitness benefit depends on genetic background in *Drosophila simulans*. *Proc. Roy. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 273, 1415–1420.
- Ehrman, L., Powell, J.R., 1982. The *Drosophila willistoni* Species Group. *The Genetics and Biology of Drosophila*, vol. 3b. Academic Press, New York, pp. 193–225.
- Gloor, G.B., Preston, C.R., Johnson-Schlitz, D.M., Nassif, N.A., Phillis, R.W., Benz, W.K., Robertson, H.M., Engels, W.R., 1993. Type I repressors of P element mobility. *Genetics* 135, 81–95.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequences alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Hedges, L.M., Brownlie, J.C., O'Neill, S.L., Johnson, K.N., 2008. *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science* 322, 702.
- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., Werren, J.H., 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? – a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol. Lett.* 281, 215–220.



- Hoffmann, A.A., Clancy, D.J., Merton, E., 1994. Cytoplasmic incompatibility in Australian populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 136, 993–999.
- Jeyaprakash, A., Hoy, M.A., 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol. Biol.* 9, 393–405.
- Keller, G.P., Windsor, D.M., Saucedo, J.M., Werren, J.H., 2004. Reproductive effects and geographical distributions of two *Wolbachia* strains infecting the neotropical beetle, *Chelymorpha alternans* Boh. (Chrysomelidae, Cassidinae). *Mol. Ecol.* 13, 2405–2420.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452.
- Miller, W.J., Riegler, M., 2006. Evolutionary dynamics of *wAu*-like *Wolbachia* variants in neotropical *Drosophila* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 826–835.
- Mirol, P.M., Routtu, J., Hoikkala, A., Butlin, R.K., 2008. Signals of demographic expansion in *Drosophila virilis*. *BMC Evol. Biol.* 8, 59–66.
- Montooth, K.L., Abt, D.N., Hofmann, J.W., Rand, D.M., 2009. Comparative genomics of *Drosophila* mtDNA: novel features of conservation and change across functional domains and lineages. *J. Mol. Evol.* 69, 94–114.
- O'Neill, S.L., Giordano, R., Colbert, A.M., Karr, T.L., Robertson, H.M., 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2699–2702.
- Riegler, M., O'Neill, S.L., 2004. The Genus *Wolbachia*. *The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. Springer-Verlag, New York.
- Riegler, M., Sidhu, M., Miller, W.J., O'Neill, S.L., 2005. Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* 15, 1428–1433.
- Riegler, M., O'Neill, S.L., 2007. Evolutionary dynamics of insect symbiont associations. *Trends Ecol. Evol.* 22, 625–627.
- Rousset, F., Bouchon, D., Pintureau, B., Juchault, P., Solignac, M., 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc. Roy. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 250, 91–98.
- Schneider, S., Roessli, D., Excoffier, L., 1999. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152, 1079–1089.
- Serbus, L.R., Casper-Lindley, C.C., Landmann, F., Sullivan, W., 2008. The genetics and cell biology of *Wolbachia* – host interactions. *Annu. Rev. Genet.* 42, 683–707.
- Sherengul, W., Kondo, R., Matsuura, E.T., 2006. Analysis of paternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genes Genet. Syst.* 81, 399–404.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 651–701.
- Shoemaker, D.D., Keller, G., Ross, K.G., 2003. Effects of *Wolbachia* on mtDNA variation in two fire ant species. *Mol. Ecol.* 12, 1757–1771.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Weeks, A.R., Turelli, M., Harcombe, W.R., Reynolds, K.T., Hoffmann, A.A., 2007. From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. *PLoS Biol.* 5, 114.
- Werren, J.H., Windsor, D.M., 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proc. R. Soc. London Ser. B* 267, 1277–1285.
- Werren, J.H., Windsor, D., Guo, L.R., 1995a. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 262, 197–204.
- Werren, J.H., Zhang, W., Guo, L.R., 1995b. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* 261, 55–71.

## CAPÍTULO 3

### REEVALUATING THE INFECTION STATUS BY THE *WOLBACHIA* ENDOSYMBIONT IN *DROSOPHILA* NEOTROPICAL SPECIES FROM THE *WILLISTONI* SUBGROUP

**Mário Josias Müller<sup>a,\*</sup>, Natália Carolina Drebes Dörr<sup>b</sup>, Maríndia Deprá<sup>a,c</sup>, Hermes José Schmitz<sup>d</sup>, Victor Hugo Valiati<sup>b,e</sup> and Vera Lúcia da Silva Valente<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Laboratório de Drosophila, Departamento de Genética, Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM), Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Laboratório de Biologia Molecular, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), São Leopoldo, RS, Brazil.

<sup>c</sup> Programa de Pós Graduação em Biologia Animal (PPGBAN), Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>d</sup> Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), Foz do Iguaçu, PR, Brazil.

<sup>e</sup> Programa de Pós Graduação em Biologia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), São Leopoldo, RS, Brazil.

Artigo aceito para publicação na revista **INFECTION, GENETICS AND EVOLUTION**.

Keywords: *wsp*, VNTR-141, *Wolbachia* low-titer, Dot-blot, qPCR

## Abstract

Infections by the endosymbiotic bacterium *Wolbachia* developed a rapid global expansion within Old World *Drosophila* species, ultimately infecting also Neotropical species. In this sense, screenings are necessary to characterize new variants of *Wolbachia* or new hosts, and also in order to map the dynamics of already known infections. In this paper, we performed a double screening approach that combined Dot-blot and PCR techniques in order to reevaluate the infection status by *Wolbachia* in species from the *willistoni* subgroup of *Drosophila*. Genomic DNA from isofemale lines descendent from females collected in the Amazonian Rainforest (n = 91) were submitted to Dot-blot, and were positive for *Wolbachia*, producing a gradient of hybridization signals, suggesting different infection levels, which was further confirmed through quantitative PCR. Samples with a strong signal in the Dot-blot easily amplified in the *wsp*-PCR, unlike most of the samples with a medium to weak signal. It was possible to molecularly characterize three *D. equinoxialis* isofemale lines that were found to be infected in a low density by a *wMel*-like *Wolbachia* strain, which was also verified in a laboratory line of *D. paulistorum* Amazonian. We also found *D. tropicalis* to be infected with the *wAu* strain and a *D. paulistorum* Andean-Brazilian semispecies laboratory line to be infected with a *wAu*-like *Wolbachia*. Moreover, we observed that all *D. willistoni* samples tested with the VNTR-141 marker harbor the same *Wolbachia* variant, *wWil*, either in populations from the South or the North of Brazil. Horizontal transfer events involving species of Old World immigrants and Neotropical species of the *willistoni* subgroup are discussed.

## 1 Introduction

Since the acceptance of the endosymbiotic theory (Sagan, 1967), symbiosis has been seen as a fundamental event in the history of life on Earth, improving biological systems complexity and impacting their evolution. In the recent evolutionary history, *Wolbachia pipientis*, a symbiotic bacterium that performs an obligatory intracellular behavior, is a great example of such manipulation. It belongs to the  $\alpha$ -proteobacterial group, the same as the ancestor of mitochondria (Gray et al., 2001), and infects a broad range of invertebrates, from filarial nematodes to most of the main arthropod groups (Hilgenboecker et al., 2008). *Wolbachia* is vertically transmitted as a maternal inheritance through the egg cytoplasm, but it can also be horizontally transmitted, via direct tissue contact between the agents or through a vector (Rozhok et al., 2011).

This endosymbiont is also known for its capacity to manipulate the host's reproduction in order to increase the frequency of infected females in the population. In the genus *Drosophila*, *Wolbachia* is able to induce two reproductive parasitism phenotypes: male killing or cytoplasmic incompatibility (CI). Male killing is clear by the observed sexual rate distortion, and it generates a relocation of male resources to its female siblings, thus, increasing infected female adaptation (Clark, 2007). The CI phenotype enhances the fitness of infected females relative to uninfected ones, since it allows an infected female to reproduce with either uninfected or infected males, while an uninfected female cannot generate offspring with an infected male (Turelli and Hoffmann, 1991). The phenotype itself and its intensity may vary from one host species to another, but also depending on which variant of *Wolbachia* is involved (Jaenike, 2007). A tangible example of such a situation is the case of the *Wolbachia* strains *wMel*, from *Drosophila melanogaster*, and *wAu*, from *D. simulans*. These strains, although

closely related phylogenetically and infecting sibling species, react in a completely different manner within their respective hosts. While *wMel* induces variable levels of CI, *wAu* usually does not cause any CI (Merçot and Charlat, 2004).

Considering its ability to increase its own frequency in the host population, *Wolbachia* may drive mitochondrial evolution, since they both share a common inheritance mode (Shoemaker et al., 2004; Xiao et al., 2012; Ilinsky, 2013). *Wolbachia* may even promote reproductive isolation with high bidirectional CI levels between different *Wolbachia* strains, as has been demonstrated between semispecies from the *Drosophila paulistorum* complex (Dobzhansky and Spassky, 1959), which belongs to the *willistoni* subgroup, in a process called infectious speciation (Miller et al., 2010).

The *willistoni* subgroup belongs to the *Sophophora* subgenus and occurs in the Neotropical region. It is constituted by six cryptic species: *Drosophila willistoni* Sturtevant, 1916, *Drosophila equinoxialis* Dobzhansky, 1946, *Drosophila paulistorum* Dobzhansky and Pavan in Burla et al., 1949, *Drosophila tropicalis* Burla and Da Cunha in Burla et al., 1949, *Drosophila insularis* Dobzhansky in Dobzhansky et al., 1957 and *Drosophila pavlovskiana* Kastritsis and Dobzhansky, 1967. Among these, only *D. insularis* and *D. pavlovskiana* are endemic to the Lesser Antilles and Guyana, respectively. The remaining species are spread throughout a wide geographic distribution and share an extensive sympatric area, mainly in the Amazonian region (Spassky et al., 1971; Cordeiro and Winge, 1995; Powell, 1997).

In the past decade, screenings for *Wolbachia* in species from this subgroup have verified infected lines from *D. willistoni* (Miller and Riegler, 2006), *D. tropicalis* (Mateos et al., 2006) and *D. paulistorum* (Miller et al., 2010). Given the dynamics of the infection shown, for instance, by the evidence for a global *Wolbachia* replacement in *D. melanogaster* (Riegler et al., 2005), the evaluation of new lines recently collected

becomes important for characterizing new variants of the endosymbiont and new hosts, and also for the assessment of *Drosophila* populations from other geographical regions. The diagnosis of *Wolbachia* infection is also fundamental before the implementation of further studies, since this bacterium has the remarkable capability to mask effects on both the host's fitness and phenotype (Clark et al., 2005).

In this paper, we reevaluated the *Wolbachia* infection status in species from the *D. willistoni* subgroup after a wide effort to sample the flies in nature. The individuals used in the experiments are all descendents from specimens recently collected in the Amazonian rainforest, and we applied a double screening approach that used both PCR and Dot-blot techniques in order to address our question.

## **2 Materials and methods**

### **2.1 Population samples**

*Drosophila* flies were collected in the Amazonian rainforest (Pará state), Northern Brazil, specifically at the Tapajós National Forest, Belterra (2°47'58.873"S/ 54°54'0.850"W) and also at Taperinha Farm, Santarém (2°26'21.967"S/ 54°41'55.446"W) in May 2011. A third sampling was held in November at Caxiuanã National Forest, Melgaço (1°44'28.7"S/ 51°27'34.6"W). Flies were captured using insect entomological net and plastic bottle traps (Tidon and Sene, 1988) containing banana and yeast bait.

Specimens were analyzed at the lab with a stereoscope, and females belonging to the *willistoni* subgroup were separated and disposed in medium with cornflour and yeast (Marques et al., 1966) in order to establish isofemale lines. These lines were coded and

maintained in Biochemical Oxygen Demand (B.O.D.) chambers at 22 °C and a 12/12-h photoperiod, while the medium was replaced weekly.

In order to compare which strains of *Wolbachia* were infecting the flies, we also used *D. willistoni* samples collected in the Atlantic Forest (used in a previous study from Müller et al., 2012), and samples collected in the Pampa biome, Bagé (Rio Grande do Sul state), Southern Brazil (31°16'10.829"S / 54°7'23.025"W).

## 2.2 *Drosophila* identification at the species level

Fly species were identified through *COI* (*Cytochrome Oxidase subunit I*, barcode region) gene sequence analysis, in a haplotype network context based on the proximity with reference haplotypes from each species (data not shown, being prepared for publication). We reconfirmed *Drosophila* species identification with analysis of male terminalia in those lines that had their respective *Wolbachia* strain molecularly characterized. For this, the male postabdomen was removed, treated with 10% KOH and acid fuchsine (Bächli et al., 2004) and the terminalia was disarticulated in glycerol. The species were discriminated by the shape of the hypandrium and epandrium, compared with Malogolowkin (1952) and Spassky (1957).

## 2.3 DNA extraction

Single female fly total DNA was extracted by the column method with a NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. Furthermore, in order to obtain higher DNA concentrations

to use in the Dot-blot assays, we performed total DNA extraction from 10 females per isofemale line, using the phenol-chloroform organic method (Sassi et al., 2005).

#### 2.4 PCR and sequencing

All PCR reactions were run in a 25  $\mu$ l volume using 1–2  $\mu$ l of DNA with a 12.5  $\mu$ l PCR Master Mix 2X (Fermentas, Lithuania) (0.05U/ $\mu$ l *Taq* DNA polymerase, 10X buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM of each dNTP), 1  $\mu$ l of each primer (20  $\mu$ M each) and ultrapure water up to the final volume. Primers TY-J-1460 5'-TACAATCTATCGCCTAAACTTCAGCC-3' and C1-N-2329 5'-ACTGTAAATATATGATGAGCTCA-3' (Simon et al., 1994) were used to amplify an approximately 0.95-kb fragment of the mitochondrial gene *Cytochrome Oxidase subunit I (COI)*. Temperature cycles were: 5 min at 95 °C, then 35 cycles of 94 °C for 40 s, 55 °C for 40 s and 72 °C for 1 min, then 72 °C for 3 min.

PCR diagnosis for *Wolbachia* infection was conducted using the primers Wsp-F 5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAACTAGCTA-3' and Wsp-R 5'-AAAAATTAAACGCTACTCCAGCTTCTGCAC-3' (Jeyaprakash and Hoy, 2000), which amplify an approximately 0.6-kb fragment from the *Wolbachia Surface Protein (wsp)* gene. Cycling conditions were 95 °C for 2 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, then 72 °C for 5 min. A negative (ultrapure water) and a positive control (*D. willistoni* Gd-H4, Guadeloupe – Lesser Antilles, 12 Genomes Consortium, Clark et al., 2007) were included in all reactions. This PCR was independently performed at least twice for each isofemale line, the first attempt using one single female DNA sample (“one-female reaction”, approximately 30



to 60 ng of DNA per reaction), and the second assay with DNA extracted from 10 females (“ten-female reaction”, approximately 250 to 500 ng of DNA per reaction).

In addition to *wsp* gene sequence analysis, *Wolbachia* strains were distinguished based on the amplicon size derived from the amplification of a minisatellite marker, Variable Number Tandem Repeats (VNTR-141). This region was amplified with the primers Wob-F 5'-GGAGTATTATTGATATGCG-3' and Wob-R 5'-GACTAAAGGTTAGTTGCAT-3' (Riegler et al., 2005), according to the following cycling conditions: initiation at 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 1 min, and then finally 72 °C for 4 min. Considering that this is a repetitive genome region that has the advantage to provide easy *Wolbachia* strain identification by simply checking the PCR product size, we included known amplicon size positive controls in each experiment: the *w*Wil strain from *D. willistoni* Gd-H4 (370-bp fragment) and *w*Mel from *D. melanogaster* Oregon (1,330 pb) (Riegler et al., 2012).

PCR results were verified through electrophoresis of the amplicons on 1% agarose gels stained with ethidium bromide and visualized under UV transillumination. PCR products (10 µl) were purified by adding 0.5 µl (1U/µl) Shrimp Alkaline Phosphatase (Promega AG, Wallisellen, Switzerland) and 0.5 µl (20U/µl) Exonuclease I (New England Biolabs, Allschwil, Switzerland). This mix was incubated at 37 °C for 45 min, followed by a 10 min inactivation step at 80 °C. Amplicons from all markers were submitted to direct sequencing at Macrogen (Macrogen Inc., Seoul, Korea), and each sample was sequenced in both directions.

## 2.5 Sequence analysis

Chromatogram quality was evaluated using Chromas Pro 1.5 (<http://www.technelysium.com.au>). Sequence similarity was obtained by comparison of similarity values to the sequences deposited at the GenBank using BLASTn (NCBI, available online). Sequence alignment was held with ClustalW implemented into Mega 5 (Tamura et al., 2011), with later edition in *BioEdit* 5.0.9 (Hall, 1999). Consensus sequence was generated based on the alignment of two independent sequences. Phylogenetic reconstruction was developed by the unweighted-pair group method with arithmetic mean analyses (UPGMA), based on the alignment of multiple *wsp* sequences using the p-distance function, also in the Mega 5 program (Tamura et al., 2011).

## 2.6 Dot-blot hybridization

Denatured DNA samples (1 µg) were transferred onto a nylon membrane (Hybond-N+; GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA). AlkPhos Direct Labelling & Detection System and the CDP-Star Kit (GE Healthcare) were used to label and detect nucleic acids according to the manufacturer's instructions. A PCR-derived *wsp* fragment from *D. willistoni* was used as probe. We used as positive controls laboratory isofemale lines from *D. melanogaster* (Oregon line – USA), *D. willistoni* (Gd-H4), *D. paulistorum* Amazonian semispecies (Belém – Brazil) and *D. tropicalis* (0801 line – San Salvador – El Salvador). To ensure *Wolbachia*-free negative controls, we used DNA samples from a plant (rice, *Oryza sativa* kindly provided by Dr. Carolina Werner Ribeiro) and from vertebrates (rodent, *Oxymycterus nasutus*, and bird, *Tringa* sp.).

## 2.7 Real-time PCR

Samples of DNA from isofemale lines of different *Drosophila* species were submitted to a relative quantification of the *wsp* gene by quantitative real-time PCR (qPCR) using a StepOne Plus® (Life Technologies) Real-Time PCR System. The qPCR conditions were: 95 °C for 5 min followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s to measure fluorescence. After, samples were heated from 60 to 95 °C at a 0.3 °C/ s temperature gradient to construct the denaturing curve of the amplified products. In order to specifically amplify a portion of the *wsp* gene, we designed with the Primer3 software (Rozen and Skaletsky, 2000) and used the following primers: WSPq-F325 (5'-GGTGCARCGTATATTAGCACTCC-3') and WSPq-R470 (5'-GAACCGAAATAACGAGCTCCAG-3'). We employed two control genes, *Glycerol 3 phosphate dehydrogenase (Gpdh)* for *D. melanogaster* (Canton S) samples, and *Tubulin* for flies belonging to the *willistoni* subgroup. *Gpdh* was amplified using the following primers: GPDH 40 (5'-GAGGTGGCTGAGGGCAACTT-3') and GPDH 155 (5'-AACCTCCACGGCATCAGCAT-3') (Deprá et al., 2009), and the *Tubulin* gene was amplified using TubulinSenseRT (5'-CGACGAACAGATGCTCAACA-3') and TubulinAntiRT (5'-GCCAATGAATGTGGCAGAC-3') (Golombieski, 2007).

All samples were analyzed in quadruplicates, and relative quantifications of amplified products were made by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method (Livak and Schmittgen, 2001) using  $C_t$  values obtained with the StepOne v2.3 software. SYBR-green (Invitrogen) was used to detect amplification and estimate  $C_t$  values and to determine specificity of amplicons by denaturing curves and melting temperatures ( $T_m$ ). *Gpdh* and *Tubulin* were used as internal control genes for the relative expression calculations for *D. melanogaster* and *willistoni* subgroup samples, respectively. We also employed the

Canton S line from *D. melanogaster* as the “basal infection” reference sample (Ventura et al., 2012).

## 2.8 Statistical analysis

Significance in *Wolbachia*-infection titer between *Drosophila* isofemale lines was estimated by calculating  $p$  values from unpaired  $t$ -tests using Systat 12 software. Statistically significant differences were assumed when  $p < 0.05$ .

## 3 Results and Discussion

### 3.1 *Drosophila* ID and *Wolbachia* double screening

We analyzed a total of 91 isofemale lines from the *willistoni* subgroup. They all had their *COI* fragment amplified through PCR, attesting the quality of the DNA used in all PCR reactions. Based on the 671 base pairs of *COI*, 45 isofemale lines were identified as *D. equinoxialis*, 25 as *D. willistoni*, 18 as *D. paulistorum* and 3 as *D. tropicalis*, corroborating the sympatry of these species in the Northern Region of Brazil.

In the Dot-blot screening (Fig. 1), all samples showed a positive signal for *Wolbachia*, although with different signal intensities. However, 76% (69/91) of the samples failed in the *wsp*-PCR diagnosis (data not shown). In general, samples with strong signals in the Dot-blot were positive in the *wsp*-PCR using DNA extracted from one single female, while samples with medium-to-low intensity were negative, though some of the latter amplified in a second reaction, when the DNA concentration was increased. While this increment in DNA concentration may have helped these samples to amplify, we cannot insure it did not inhibit the reaction in the others.

Bourtzis et al. (1996) developed a double screening using both PCR and Dot-blot with DNA from 41 *Drosophila* stocks from 30 different species using a 480-bp *dnaA* fragment as a probe; they obtained around 6% of the positive samples in the PCR to be negative in the Dot-blot, but no sample negative in the PCR was positive in the Dot-blot. On the other hand, our results with samples from the *willistoni* subgroup showed higher sensitivity with the Dot-blot and lower sensitivity with the PCR. This can be due to the use of a bigger fragment as a probe, the higher quantity of total DNA applied to the membrane and/or the lower infection rate in some lines tested.

Nevertheless, PCR amplification issues with *Wolbachia* molecular markers have already been reported (Augustinos et al., 2011) and can be caused by either low-titer or multiple infections (Arthofer et al., 2009; Arthofer et al., 2011).

In order to quantify the different infection levels suggested by the Dot-blot, we selected representative samples and performed a quantitative PCR experiment. Furthermore, we were able to verify compatible patterns in the qPCR results, that is, samples with stronger signals in the Dot-blot showed the higher relative quantification in the qPCR, while samples with weak Dot-blot signals presented lower relative quantification (Fig. 1 and 3).

We summarize below the results and discuss their implications for each species.

### 3.2 *Wolbachia* in *D. willistoni*

Among isofemale lines from the same species, *D. willistoni* was the one whose samples showed the largest signal intensity differences in the Dot-blot. All samples with a strong signal amplified *wsp*, both in the one and ten-female PCR reactions. On the

other hand, those with a weak signal did not amplify in any reaction, except for the sample (10D). This suggests a remarkable difference concerning *Wolbachia* density among isofemale lines tested, which was further confirmed by the qPCR results. Samples with strong Dot-blot signal and respective high relative quantification showed a minimum of around 9 million-fold (sample 3A) and a maximum of 50 million-fold (sample 5A) more *Wolbachia* infection than the reference sample. Comparatively, samples with weak Dot-blot signal presented a minimum of 31-fold (sample 1A) and a maximum of approximately 2,000-fold (sample 6A) more infection than the Canton S line (Fig. 3A).

In our previous work with *D. willistoni* (Müller et al., 2012), we found 55% of the individuals to be positive in the *wsp*-PCR diagnosis. With this new approach aggregating the Dot-blot and the qPCR, it was demonstrated that all isofemale lines tested were indeed infected. We have also observed a pattern in which samples with a weak signal in the Dot-blot usually do not amplify in the *wsp*-PCR, generating false negatives. These facts may have led to an underestimation of the prevalence of infection by *Wolbachia* in *D. willistoni* when using standard PCR as the only diagnosis method.

All *D. willistoni* isofemale lines that amplified in the *wsp*-PCR were tested with the VNTR-141 marker and amplified a fragment of the same size, corresponding to the *w*Wil strain, from the south (Pampa Biome and Atlantic Forest) to the north of Brazil (Amazonian Rainforest) (Fig. 2). Therefore, these results point to an infection status with continental magnitude by a *w*Wil variant in this species (Fig. 2). Moreover, it was not possible to determine which *Wolbachia* strain is infecting *D. willistoni* isofemale lines in low-titer.

### 3.3 *Wolbachia* in *D. tropicalis*

Including the laboratory line (0801) used as the positive control, we tested four *D. tropicalis* isofemale lines. Two of them generated a weak signal and two of them generated a strong signal in the Dot-blot. Again, only samples with a strong signal were positive in the *wsp*-PCR and have also amplified the minisatellite VNTR-141. The amplicons from the latter marker presented the corresponding size of the *wAu* line from *D. simulans*, and this identification was further reconfirmed through VNTR-141 sequence analysis.

*Wolbachia* was previously detected in two isofemale lines from this species through PCR using *I6S* and *wsp* markers, which led to the proposition that it would be the *wWil* strain infecting (Mateos et al., 2006). However, these markers are not good enough to correctly distinguish *wWil* from *wAu*, although they can be discriminated through analysis of the size fragment obtained from VNTR-141 amplification.

### 3.4 *Wolbachia* in *D. equinoxialis*

For the first time, *D. equinoxialis* was detected to harbor *Wolbachia*. Previous screenings in lines from this species did not detect the bacterium (Mateos et al., 2006). This may have occurred due to the use of uninfected lines, or it may also be the case of false negatives due to *Wolbachia* low-titer, since the 45 samples evaluated in our survey showed a weak intensity signal in the Dot-blot, and none of them amplified in the one-female *wsp*-PCR reaction. Moreover, in the real time PCR experiment, *D. equinoxialis* samples showed a relatively low *Wolbachia* quantification pattern, ranging from 1.48-fold (sample 7D) to 92-fold (5E) more *Wolbachia* than Canton S, without such marked difference in the infection levels as we have seen in *D. willistoni* (Fig. 3B).

Seven samples amplified the *wsp* fragment in the ten-female *wsp*-PCR reaction. From these, it was possible to perform direct sequencing of three amplicons, which sequences had 100% similarity with the sequence deposited as *wMel* line from *D. melanogaster*.

None of the samples amplified the minisatellite marker VNTR-141, which could specify the strain infecting those flies. Therefore, as the infection in *D. melanogaster* can be distinguished in five different variants of *Wolbachia* (Riegler et al., 2005), we will refer to this variant found in *D. equinoxialis* as a *wMel*-like.

### 3.5 *Wolbachia* in *D. paulistorum*

All samples of *D. paulistorum* exhibited weak signal intensity in the Dot-blot, and reflected similar relative quantification results in the qPCR, from 16-fold (sample 3B) to 69-fold (sample 9E) more *Wolbachia* than Canton S reference line (Fig. 3C). Only two samples out of 18 amplified *wsp* in the second reaction (9F and the control 7G). From these, only the sequence of the laboratory line from the Amazonian semispecies (Belém – Brazil) showed a good quality in the chromatogram. However, the sequence obtained is different from the one previously deposited as the specific *Wolbachia* from this semispecies, a *wRi*-like (Miller et al, 2010), although it reveals 100% maximum identity with the *wMel* sequence.

Apart from those samples, it was possible to amplify *wsp* from a *D. paulistorum* Andean-Brazilian (AB) semispecies laboratory line, showing 100% maximum identity with the *wsp* sequence deposited for *D. paulistorum* Orinocan semispecies.



The non-amplification in a standard PCR is expected to 5 out of the 6 *D. paulistorum* semispecies, Amazonian included, since they were reported to be infected with low-titer *Wolbachia* (Miller et al, 2010). Therefore, the low density of the endoparasite can result in false negatives in the *wsp*-PCR.

### 3.6 *Wolbachia* in *D. insularis*

The *D. insularis* SL3 laboratory line was only submitted to the qPCR experiment, showing approximately 167-fold more *Wolbachia* infection than the reference line, Canton S (Fig. 3A). This stands as the first registration of *Wolbachia* in hosts belonging to this species, although the characterization of this particular *Wolbachia* strain was not possible due to its low infection level.

### 3.7 *Wolbachia* low-titer in the *willistoni* subgroup

All five species from the *willistoni* subgroup analyzed in this paper had isofemale lines presenting low-titer *Wolbachia*. Low infection levels had been previously reported only in *D. paulistorum* (Miller et al., 2010). It is clear now that this low infection level may have been responsible for the lack of *Wolbachia* detection in *D. equinoxialis* in previous screenings that only used conventional PCR (Mateos et al., 2006; Miller and Riegler, 2006). All isofemale lines from this species and all *D. paulistorum* lines tested exhibited only low-titer *Wolbachia*, unlike *D. willistoni* and *D. tropicalis*, which showed isofemale lines with both high and low infection levels. In the case of *D. willistoni*, the two patterns of infection verified through hybridization (Fig. 1) were shown to be statistically different ( $p = 0.000$ ) in the qPCR analysis (Fig. 3).

### 3.8 *Wolbachia* acquisitions between *Drosophila* species from the Old World and the *willistoni* subgroup

The strains *w*Wil, *w*Au and *w*Mel are all phylogenetically related (Miller et al., 2006). However, the acquisition of these *Wolbachia* strains in *D. willistoni*, *D. tropicalis*, *D. equinoxialis* and *D. paulistorum* Amazonian semispecies analyzed in this study is more likely consistent with horizontal transmission events.

Based on the *wsp* phylogeny, Miller and Riegler (2006) have proposed the hypothesis that *w*Au-like variants evolved in Neotropical species from the *saltans* group, and those would be the potential donors for the horizontal transmission to *D. willistoni*, ultimately resulting in the *w*Wil variant. *D. willistoni* would have been the likely donor to the Old World immigrant species *D. simulans*, based on the geographic distribution overlap of these species and in their *wsp* and *ftsZ* genes sequence identity. Therefore, *w*Wil would be the ancestor of *w*Au infection in *D. simulans*.

We partially reproduced the phylogeny of the aforementioned study, yet with the addition of new sequences (Fig. 4; for GenBank accession numbers see Supplementary Material). With the detection of *w*Au in *D. tropicalis*, this species becomes a better candidate than *D. willistoni* as a donor of the infection to *D. simulans*. As well as *D. willistoni*, *D. tropicalis* populations also occur in sympatry with *D. simulans* populations in a wide geographic distribution, from the north of South America to Central America.

*Wolbachia* strains *w*Wil from *D. willistoni* and *w*Au from *D. simulans* share the same *wsp* sequence (Fig. 4), but exhibit dissonant information in their respective minisatellite (VNTR-141). Furthermore, *w*Wil is considered as a recent infection in *D.*

*willistoni*. In this context, both *D. tropicalis* and *D. simulans* emerge as potential *Wolbachia* donors to *D. willistoni*. Therefore, not only *wAu*-like variants display a Neotropical origin, but the very *wAu* infection, primarily characterized in *D. simulans*, in fact probably emerged in the *willistoni* subgroup, and may be the ancestor of the *wWil* infection in *D. willistoni*, where the minisatellite marker suffered nucleotide deletions.

In the case of the *wMel*-like variant found both in *D. equinoxialis* and *D. paulistorum* Amazonian, the donor species could have been either *D. simulans*, where *wMel* was also reported (Mateos et al., 2006), or *D. melanogaster* (Fig. 3B). These species from the *melanogaster* subgroup invaded the American continent within the last few hundred years (Irvin et al., 1998; Keller, 2007), yet *D. simulans* entered later than *D. melanogaster*, although there may have been more than one introduction event (Hamblin and Veuille, 1999). From the ecological point of view, it is more likely that the donor species is *D. simulans*, since *D. melanogaster* is a domestic species that usually does not invade natural environments (Keller, 2007). On the other hand, *D. simulans* has a less close connection with humans and it is not so restricted to urban environments, in fact being very frequent from savanna to forestry environments with a mild to high level of anthropic action (Sene et al., 1980; Ferreira and Tidon, 2005). More generalist Neotropical species, such as from the *willistoni* group, coexist not only geographically, but also in the same environments, often even sharing oviposition sites (Valente and Araújo, 1986; Valiati and Valente, 1996), synchronously and syntopically. Parasite mites live associated to drosophilid communities, and they might work as horizontal transmission vectors, as already demonstrated in the laboratory (Huigens et al., 2004; Rozhok et al., 2011). Therefore, considering that the horizontal transmission requires at least one contact form between the donor and the receiver, or even through a

vector, *Wolbachia* transmission from *D. simulans* to *D. equinoxialis* and *D. paulistorum* Amazonian is a quite plausible situation. However, even though it is less likely ecologically, we cannot discard *D. melanogaster* as the infection donor, since populations from this species present a high prevalence of the *wMel* variant (Nunes et al., 2008). In either case, the possible mechanisms of horizontal transmission remain to be further investigated.

An independent evidence of horizontal transmission involving Old World drosophilids and a Neotropical species comes from the characterization of the first *Wolbachia* infection in a *D. paulistorum* Amazonian line (Miller et al., 2010). The *wsp* sequence from this infection has 100% similarity with the *wRi* sequence from *D. simulans* (Fig. 4), suggesting the same transmission flow, that is, from *D. simulans* to a Neotropical species.

#### 4 Conclusions

Our results suggest that there are differences in the infection levels of *Wolbachia* among species from the *willistoni* subgroup of *Drosophila*, both inter and intraspecific. The Dot-blot technique was more suitable for *Wolbachia* presence/ absence detection than standard PCR, since amplification through standard PCR frequently failed in the case of low-titer *Wolbachia*, generating false-negative diagnosis. Anyway, we were able to recover our Dot-blot results using the highly sensitive method of real-time PCR, confirming the difference in infection levels found among isofemale lines. Aside from the qPCR, the low-titer issue could also be circumvented by the PCR-blot approach, a technique that combines non-quantitative PCR and hybridization (Arthofer et al., 2009), and allows the tracing and further strain characterization of low-titer *Wolbachia*.

The *Wolbachia* variant *wWil* is present in *D. willistoni* populations from the south or the north of Brazil, showing an infection of continental proportions. The intraspecific differences in the levels of infection remain to be investigated.

*D. tropicalis* is the more likely donor of the *wAu* infection to *D. simulans*. This *Wolbachia* variant probably has its origin in the *willistoni* subgroup and possibly is the direct ancestor of the *wWil* variant from *D. willistoni*, which evolved shortening the size of its VNTR-141. However, we cannot suggest the donor species of the infection to *D. willistoni*, since it could have been both *D. tropicalis* and *D. simulans*.

Two species, *D. equinoxialis* and *D. paulistorum* Amazonian, both present a *wMel*-like variant infection, suggesting horizontal transmission coming from the Old World invasive species *D. melanogaster* or *D. simulans*, the latter being more plausible from the ecological point of view. Additional screenings in natural populations from these two cosmopolitan species in South and Central America could provide information that may elucidate the donor species of the infection to species from the *willistoni* subgroup.

## **Acknowledgments**

We thank Dr. Marlúcia B. Martins (Museu Paraense Emílio Goeldi – MPEG) for the authorization to collect flies at the Tapajós National Forest; Dr. Juliana Cordeiro for the help screening the biological material and accommodation in Belém – PA; to MSc. Yukari Okada (UFOPA), Mr. Aderbal Maia de Queiróz and Mr. Louro Lima (Experimento de Grande Escala – Atmosfera na Amazônia/ LBA) for the kind reception and logistic help in the field. We thank Mr. Artemio Guimarães Rego and Ms. Graziela Bentes Rego for the authorization to collect flies and lodging at the historical Taperinha

Farm, Santarém – PA. We thank Dr. Claudia Rohde for the samples collected at the Caxiuanã National Forest, Melgaço – PA, to Dr. Jeffrey R. Powell for kindly providing the SL3 line of *D. insularis*, and Dr. Louis Bernard Klackzo for the *D. melanogaster* Canton S line. The authors are also grateful to the biologist Felipe Benites for his helpful suggestions, the biologist Carine von Mühlen for technical support, the graduate student Mariana Mello for the assistance maintaining the isofemales lines, Mr. Matheus Guimarães da Silva for all the help with the figures and Dr. Carolina Werner Ribeiro for the help with the qPCR results analyses. This study was funded by fellowships and grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq, CNPq (process 480306/2012-5), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES, PRONEX-FAPERGS (10/0028-7) and Universidade do Vale do Rio dos Sinos/UNISINOS.

## References

- Arthofer, W., Riegler, M., Schneider, D., Krammer, M., Miller, W., Stauffer, C., 2009. Hidden *Wolbachia* diversity in field populations of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). *Mol. Ecol.* 18, 3816–3830.
- Arthofer, W., Riegler, M., Schuler, H., Schneider, D., Moder, K., 2011. Allele intersection analysis: a novel tool for multi locus sequence assignment in multiply infected hosts. *PLoS One* 6, 9.
- Augustinos, A.A., Santos-Garcia, D., Dionyssopoulou, E., Moreira, M., Papanagiotou, A., 2011. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in natural populations of aphids: is the hidden diversity fully unraveled? *PLoS ONE* 6, 12.
- Bächli, G., Vilela, C.R., Escher, A.S., Saura, A., 2004. The Drosophilidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomol. Scand.* 39, 1–362.
- Bourtzis, K., Nirgianaki, A., Markakis, G., Savakis, C., 1996. *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. *Genetics* 144, 1063–1073.

Clark, M.E., Anderson, C.L., Cande, J., Karr, T.L., 2005. Widespread prevalence of *Wolbachia* in laboratory stocks and the implications for *Drosophila* research. *Genetics* 170, 1667–1675.

Clark, M.E., 2007. *Wolbachia* symbiosis in arthropods. *Issues Infect Dis Basel Karger* 5, 90–123.

Cordeiro, A.R., Winge, H., 1995. Levels of evolutionary divergence of *Drosophila willistoni* sibling species, in: Levine, L. (Ed.), *Genetics of Natural Populations - The Continuing Importance of Theodosius Dobzhansky*. Columbia University Press, New York, pp. 262–280.

Deprá, M., Valente, V.L.S., Margis, R., Loreto, E.L.S., 2009. The *hobo* transposon and *hobo*-related elements are expressed as developmental genes in *Drosophila*. *Gene* 448: 57–63.

Dobzhansky, T., Spassky, B., 1959. *Drosophila paulistorum*, a cluster of species *in statu nascendi*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 45, 419–428.

Ferreira, L. B., Tidon, R., 2005. Colonizing potential of Drosophilidae (Insecta, Diptera) in environments with different grades of urbanization. *Biodivers. Conserv.* 14, 1809–1821.

Golombieski, R. M., 2007. Expressão de hsp70 e hsp83 no desenvolvimento de *Drosophila* em resposta ao estresse químico causado por disseleneto de difenila e paraquat. 2007. Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

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

Hamblin, M. T., Veuille, M., 1999. Population structure among African and derived populations of *Drosophila simulans*: evidence for ancient subdivision and recent admixture. *Genetics* 153, 305–317.

Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., Werren, J. H. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? – a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiology Letters* 281, 215–220.

Huigens, M. E., De Almeida, R. P., Boons, P. A. H., Luck, R. F., Stouthamer, R., 2004. Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps. *Proc. Biol. Sci.* 271, 509–515.

Ilinsky, Y., 2013. Coevolution of *Drosophila melanogaster* mtDNA and *Wolbachia* Genotypes. *PLoS One* 8, 1.

Irvin, S.D., Wetterstrand, K.A., Hutter, C.M., Aquadro, C.F., 1998. Genetic variation and differentiation at microsatellite loci in *Drosophila simulans*. Evidence for founder effects in new world populations. *Genetics* 150, 777–790.

Jaenike, J., 2007. Spontaneous emergence of a new *Wolbachia* phenotype. *Evolution: Int. J. Organic Evol.* 61, 2244–2252.

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

Keller, A., 2007. *Drosophila melanogaster*'s history as a human commensal. *Current Biol.* 17, 77–81.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ . *Methods* 25, 402–408.

Malogolowkin, C., 1952. Sobre a genitália dos "Drosophilidae" (Diptera). III. Grupo *willistoni* do gênero *Drosophila*. *Rev. Bras. Biol.* 12, 79–96.



- Marques, E.K., Napp, M., Winge, H., Cordeiro, A.R., 1966. A corn meal, soybean flour, wheat germ medium for *Drosophila*. *Drosophila Inf. Serv.* 41, 187.
- Mateos, M., Castrezana, S.J., Nankivell, B.J., Estes, A.M., Markow, T.A., Moran, N.A., 2006. Heritable endosymbionts of *Drosophila*. *Genetics* 174, 363–376.
- Merçot, H., Charlat, S., 2004. *Wolbachia* infections in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: polymorphism and levels of cytoplasmic incompatibility. *Genetica* 120, 51–59.
- Miller, W.J., Riegler, M., 2006. Evolutionary dynamics of *wAu*-like *Wolbachia* variants in neotropical *Drosophila* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 826–835.
- Miller, W.J., Ehrman, L., Schneider, D., 2010. Infectious speciation revisited: impact of symbiont-depletion on female fitness and mating behavior of *Drosophila paulistorum*. *PLoS Pathogens* 6, 17.
- Müller, M.J., Von Mühlen, C., Valiati, V.H., Valente, V.L.S., 2012. *Wolbachia pipientis* is associated with different mitochondrial haplotypes in natural populations of *Drosophila willistoni*. *J. Invert. Pathol.* 109, 152–155.
- Nunes, M.D.S., Nolte, V., Schlötterer, C., 2008. Nonrandom *Wolbachia* infection status of *Drosophila melanogaster* strains with different mtDNA haplotypes. *Mol. Biol. Evol.* 25, 2493–2498.
- Powell, J.R., 1997. *Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The Drosophila Model*, Oxford University Press, Oxford.
- Riegler, M., Sidhu, M., Miller, W.J., O'Neill, S.L., 2005. Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* 15, 1428–1433.
- Riegler, M., Iturbe-Ormaetxe, I., Woolfit, M., Miller, W.J., O'Neill, S.L., 2012. Tandem repeat markers as novel diagnostic tools for high resolution fingerprinting of *Wolbachia*. *BMC Microbiol.* 12, S12.

Rozen, S., Skaletsky, H.J., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386

Rozhok, A., Bilousov, O., Kolodochka, L., Zabludovska, S., Kozeretska, I., 2011. Horizontal transmission of intracellular endosymbiotic bacteria: a case between mites and fruit flies and its evolutionary implications. *Drosophila Inf. Serv.* 94, 74–79.

Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 651–701.

Sagan, L., 1967. On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.* 14, 255–274.

Sassi, A.K., Herédia, F., Loreto, E.L., Valente, V.L.S., Rohde, C., 2005. Transposable elements *P* and *gypsy* in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genet. Mol. Biol.* 28, 734–739.

Sene, F.M., Val, F.C., Vilela, C.R., Pereira, M.A.Q.R., 1980. Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* species within morphoclimatic domains of Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia* 33, 315–326.

Shoemaker, D.D., Dyer, K.A., Ahrens, M., McAbee, K., Jaenike, J., 2004. Decreased diversity but increased substitution rate in host mtDNA as a consequence of *Wolbachia* endosymbiont infection. *Genetics* 168, 2049–2058.

Spassky, B., 1957. Morphological differences between sibling species of *Drosophila*. *Genetics of Drosophila* 5721, 48–61.

Spassky, B., Richmond, R.C., Pérez-Salas, S., Pavlovsky, O., Mourão, C.A., Hunter, A.S., Hoenigsberg, H., Dobzhansky, T., Ayala, F.J., 1971. Geography of the sibling species related to *Drosophila willistoni*, and of the semispecies of the *Drosophila paulistorum* complex. *Evolution* 25, 129–143.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.

Tidon, R., Sene, F.M., 1988. A trap that retains and keeps *Drosophila* alive. *Drosophila Inf. Serv.* 67, 90.

Turelli, M., Hoffmann, A.A., 1991. Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila*. *Nature* 353, 440–442.

Valente, V.L.S., Araújo, A.M., 1986. Comments on breeding sites of *Drosophila willistoni* Sturtevant (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Entomol.* 30, 281–286.

Valiati, V.H., Valente, V.L.S., 1996. Observations on ecological parameters of urban populations of *Drosophila paulistorum* Dobzhansky & Pavan (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Entomol.* 40, 225–231.

Ventura, I.M., Martins, A.B., Lyra, M.L., Andrade, C.A.C., Carvalho, K.A., Klaczko, L.B., 2012. *Spiroplasma* in *Drosophila melanogaster* populations: prevalence, male-killing, molecular identification, and no association with *Wolbachia*. *Microb. Ecol.* 64, 794–801.

Xiao, J., Wang, N., Murphy, R., Cook, J., Jia, L., Huang, D., 2012. *Wolbachia* infection and dramatic intraspecific mitochondrial DNA divergence in a fig wasp. *Evolution: Int. J. Organic Evol.* 66, 1907–1916.

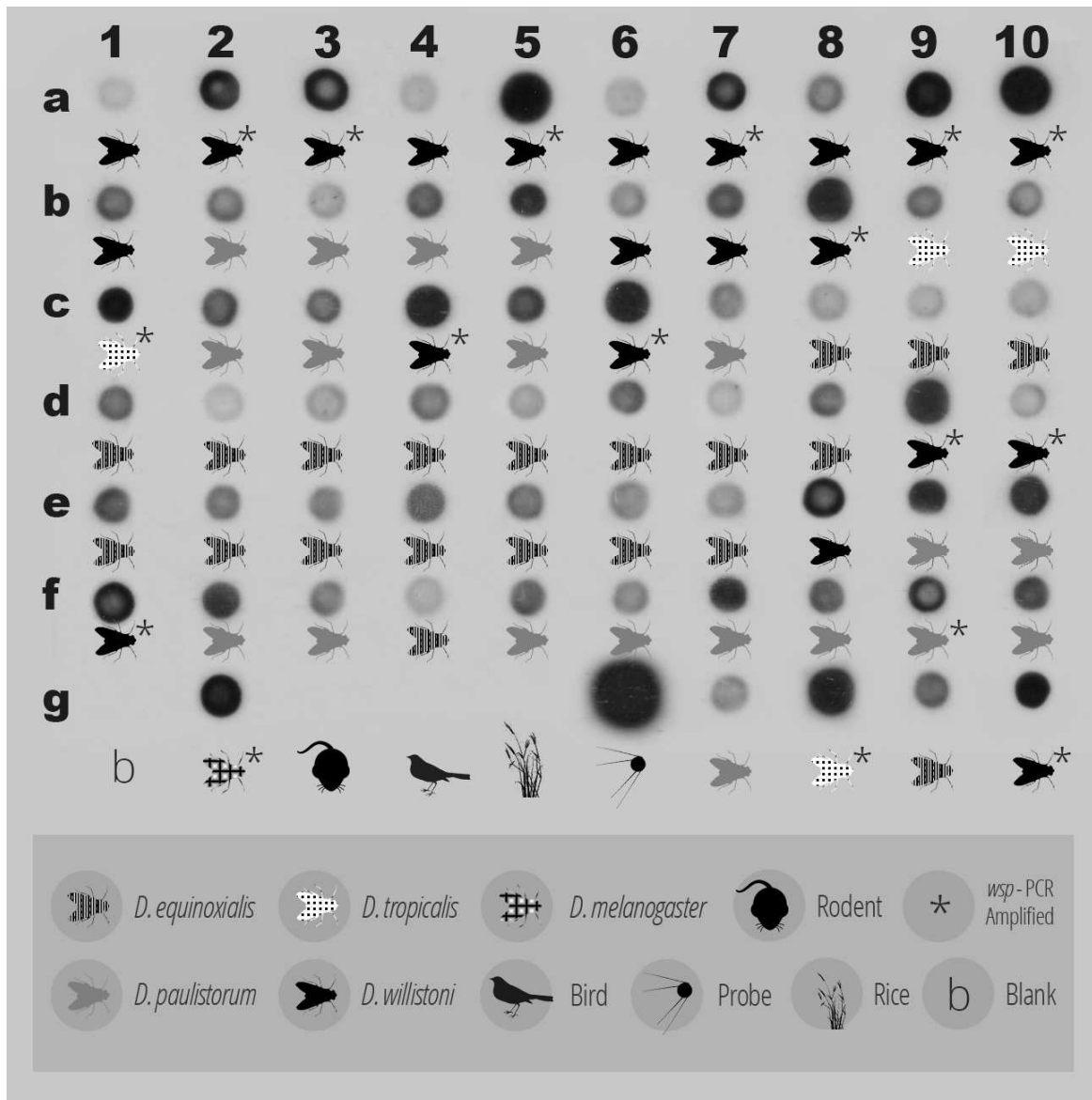


Figure 1. Dot-blot assay autoradiogram to determine *Wolbachia* presence or absence. Iconographies under each dot specify DNA origin and also indicate which samples amplified in the *wsp*-PCR diagnosis.

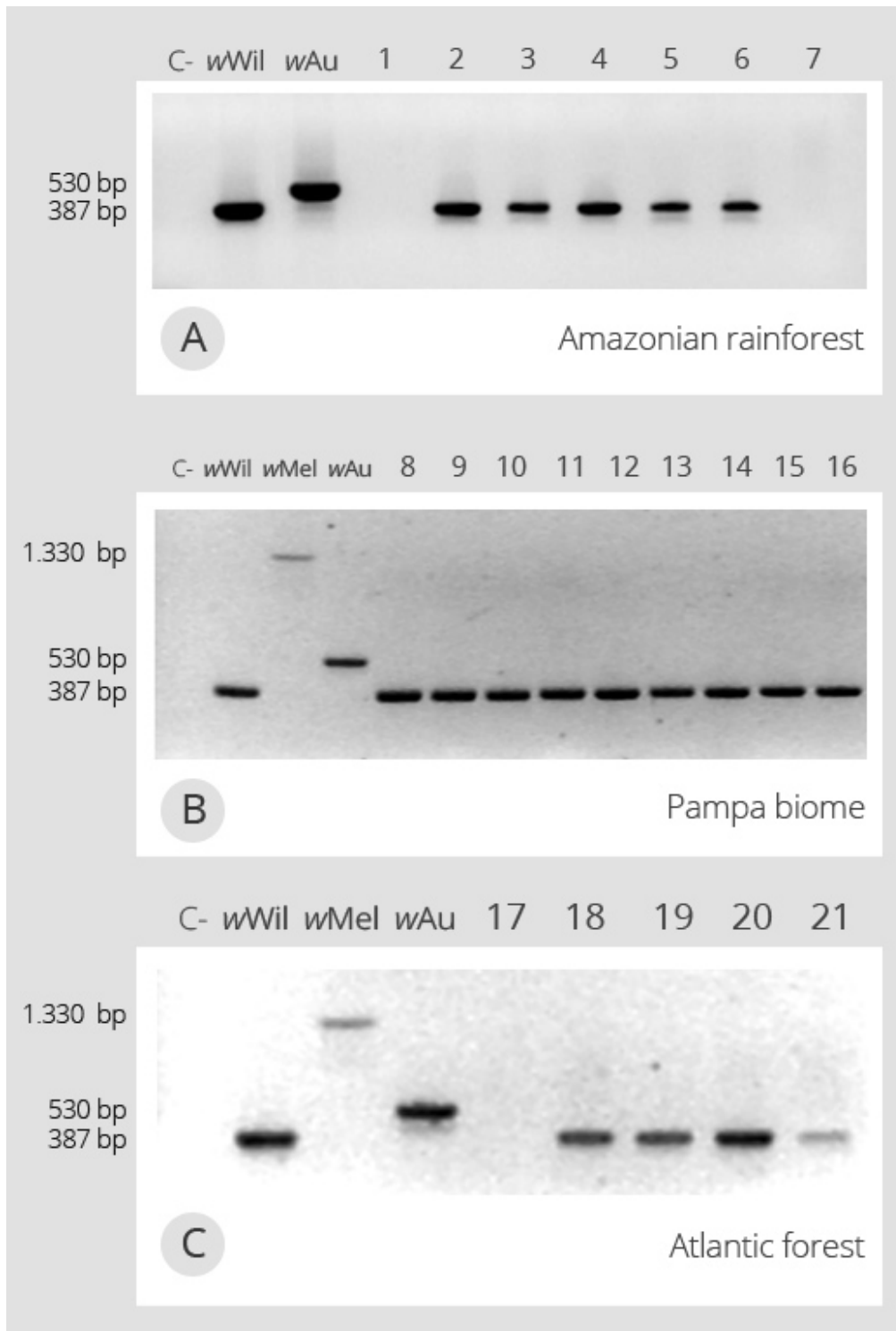


Figure 2. PCR-amplification of the VNTR-141 minisatellite marker in DNA samples from flies collected in the Amazonian rainforest (A), Pampa biome (B) and Atlantic forest (C). C-: negative control. wWil (387 bp), wMel (1.330 bp) and wAu (530 bp) represent the size positive controls, amplified from *D. willistoni* GdH4, *D. melanogaster* Oregon and *D. tropicalis* 0801, respectively. Collection Sites: Tapajós National Forest (samples 1-7); Bagé/ RS (8-16); Pontal do Paraná/ PR (17); Osório/RS (18); Laguna/SC (19) and Maracajá/SC (20–21).

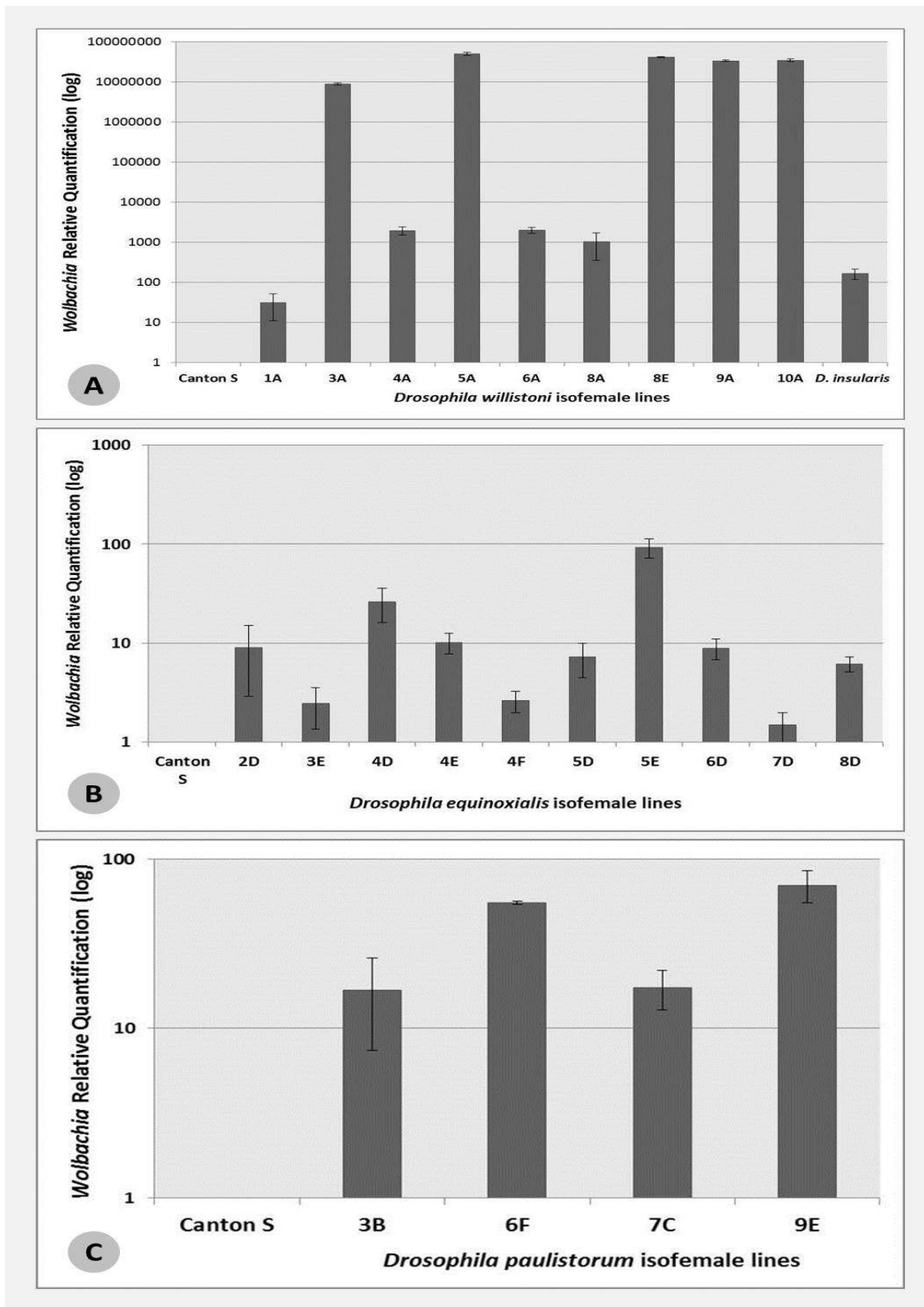


Figure 3. Relative quantification of *Wolbachia* infection in isofemale lines from *Drosophila willistoni* (A), *D. equinoxialis* (B) and *D. paulistorum* (C) compared to the reference *D. melanogaster* line, Canton S, estimated through quantitative PCR. The relative quantifications of the samples presented in the X axis are compatible with their respective hybridization signal intensities in the Dot-blot (Fig. 1).

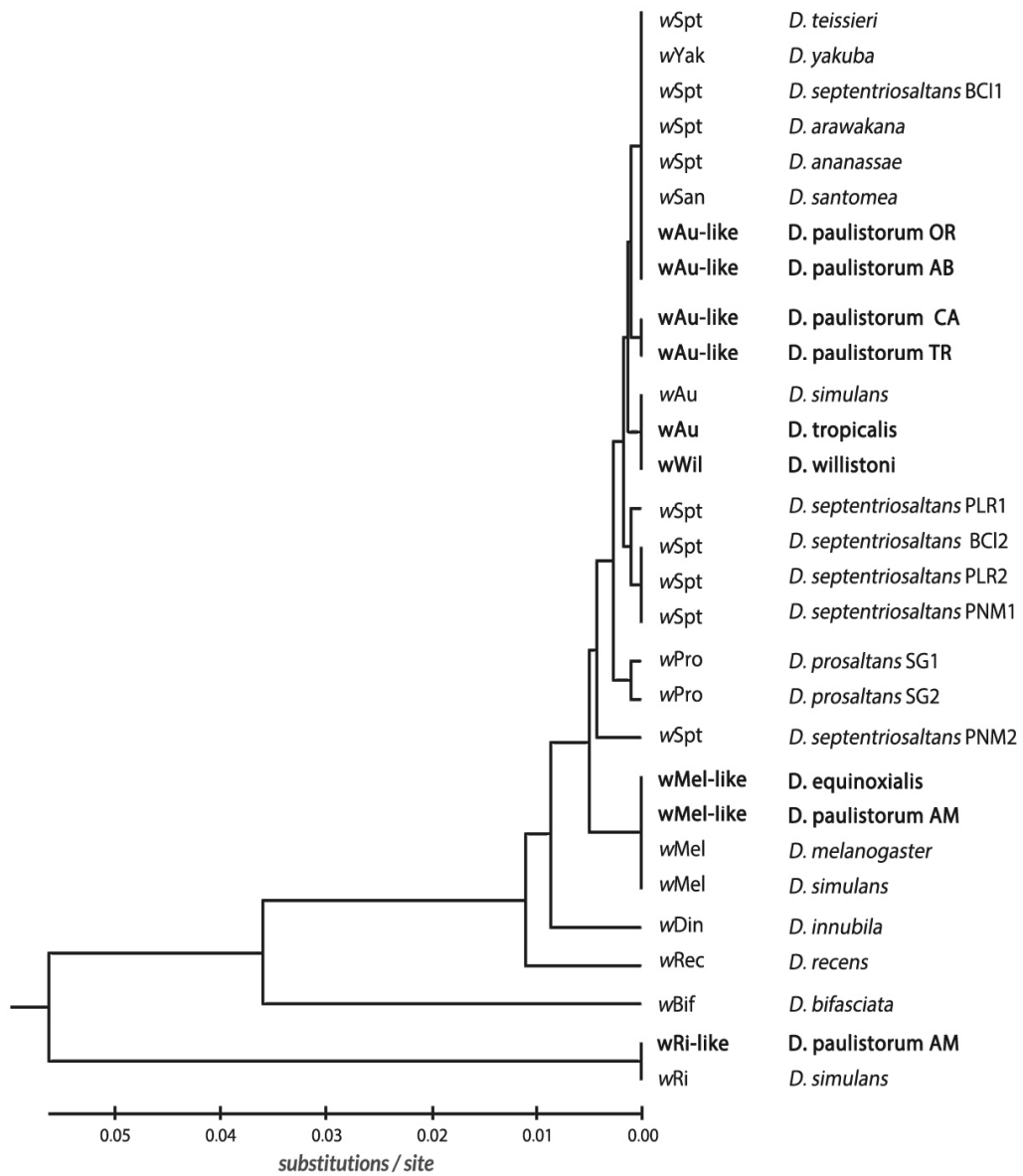


Figure 4. Similarity cladogram built by the UPGMA method based on the *wsp* sequence alignment. Host species from the *willistoni* subgroup are written in bold.

## CAPÍTULO 4

### COMPLEXA EVOLUÇÃO MITOCONDRIAL NO SUBGRUPO DA *DROSOPHILA WILLISTONI*: EVIDÊNCIA DE INTROGRESSÃO E IMPLICAÇÕES PARA DNA *BARCODING*

**Mário Josias Müller<sup>a</sup>, Victor Hugo Valiati<sup>b,c,\*</sup> e Vera Lúcia da Silva Valente<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup> Laboratório de Drosophila, Departamento de Genética, Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM), Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Laboratório de Biologia Molecular, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), São Leopoldo, RS, Brazil.

<sup>c</sup> Programa de Pós Graduação em Biologia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), São Leopoldo, RS, Brazil.

\* Ambos os autores contribuíram igualmente para este estudo.

Artigo em preparação para submissão à revista **INSECT MOLECULAR BIOLOGY**.



Palavras-chave: subgrupo *willistoni*, *COI*, introgressão, *Wolbachia*, *kl-3*, DNA *barcoding*

## Resumo

O subgrupo críptico da *Drosophila willistoni*, um conjunto de espécies neotropicais, oferece um complexo desafio para taxonomistas e uma oportunidade para testar métodos baseados em DNA *barcoding*. Foram sequenciados a região 5' da *COI* de amostras de populações naturais e de linhagens de laboratório previamente identificadas por métodos taxonômicos tradicionais. Identificação baseada em distância genética de *COI* não discrimina corretamente as espécies. Um haplótipo compartilhado entre as espécies *D. willistoni* e *D. insularis* aparece como a primeira evidência de introgressão mitocondrial em populações naturais. Introgressão e diferentes infecções por *Wolbachia* parecem em parte responder pelos padrões de variação no *mtDNA*. Devido à complexa evolução mitocondrial no subgrupo *willistoni*, nós sugerimos o uso de um segmento do gene nuclear *kl-3* para a identificação molecular destas espécies.

## Introdução

Quando Theodosius Dobzhansky (1900-1975) proferiu a frase “*As espécies existem independente de nossa habilidade para identificá-las*” foi inspirado em parte pelo seu trabalho empírico com espécies de *Drosophila*. Na região neotropical foi o subgrupo críptico da *Drosophila willistoni* Sturtevant, 1916, que lhe proporcionou um desafio taxonômico, tendo participado da maior parte das descrições das espécies do subgrupo: *Drosophila equinoxialis* Dobzhansky, 1946, *Drosophila paulistorum* Dobzhansky and Pavan in Burla *et al.*, 1949, *Drosophila tropicalis* Burla and Da Cunha in Burla *et al.*, 1949, *Drosophila insularis* Dobzhansky in Dobzhansky *et al.*, 1957 e *Drosophila pavlovskiana* Kastritsis and Dobzhansky, 1967. Também descreveu baseado em testes de cruzamento, as chamadas semiespécies ou raças geográficas do complexo da superespécie *D. paulistorum* (Dobzhansky & Spassky, 1959): Amazônica, Andino-Brasileira, Centro-americana, Orinocana e Transicional, por ele denominadas espécies *in status nascendi* por apresentarem entre si um forte isolamento reprodutivo. Mais tarde uma sexta semiespécie, Interior, foi detectada (Pérez-Salas *et al.*, 1970).

A despeito da alta similaridade na morfologia externa, as espécies do subgrupo *willistoni* mostram diferenças em estruturas morfológicas na terminália dos machos, hipândrio e epândrio, (Malogolowkin, 1952; Spassky, 1957), na organização dos cromossomos politênicos (Rohde *et al.*, 2006) e em suas biomoléculas, sistemas aloenzimáticos (Garcia *et al.*, 2006) e sequências de DNA (Robe *et al.*, 2010). Contudo, a maior parte destes métodos taxonômicos envolve alto grau de treinamento para execução e ou interpretação dos resultados. Neste contexto, o uso de DNA *barcoding* mostra-se uma ferramenta padronizada, de relativo baixo custo e fácil execução, que poderia proporcionar identificações precisas por parte de não taxonomistas.

Proposto a cerca de uma década, o método taxonômico de DNA *barcoding* (Hebert *et al.*, 2003) faz uso de uma porção 5' de 648 pares de bases do gene *Citocromo Oxidase subunidade I (COI)* para a identificação de espécies animais baseado na quantidade de distância genética entre as sequências amostradas. Esta metodologia prediz que as distâncias genéticas intraespecíficas e interespecíficas serão distribuídas bimodalmente e assim haverá um intervalo (*gap*) de divergência entre sequências de diferentes espécies do mesmo gênero (Alexander *et al.*, 2009). O conhecimento da variabilidade tanto intraespecífica quanto interespecífica da sequência em dado grupo é fundamental para se estabelecer um limiar (*threshold*) de distância genética apropriado para a separação das espécies. De modo geral, o limite de 3% de divergência genética funciona relativamente bem para separar espécies que resultaram de especiação alopátrica e gradualmente acumularam diferentes mutações (Sbordoni, 2010). DNA *barcoding* tem sido aplicado a problemática das espécies crípticas de drosofilídeos e tanto casos de sucesso na detecção de novas espécies (Yassin *et al.*, 2008), quanto exemplos onde a ferramenta falhou (Yassin *et al.*, 2010) foram relatados.

Sequências de genes mitocondriais das espécies do subgrupo *willistoni* já foram avaliadas em nível filogenético (Gleason *et al.*, 1998; Robe *et al.*, 2010) e as relações recuperadas mostraram incongruências quando comparadas às obtidas com genes nucleares. A maior parte das incongruências seria resultado provavelmente de eventos de hibridização entre as espécies, com a ocorrência de introgressão assimétrica da mitocôndria. Com uma história evolutiva diferente dos marcadores nucleares, *COI* falha em ser uma boa referência como DNA *barcoding* dentro das espécies do subgrupo *willistoni* (Robe *et al.*, 2010). Contudo, vale salientar que os dois estudos citados não usaram a região proposta como *barcode* no gene *COI* e avaliaram a variabilidade intraespecífica em um número reduzido de sequências. O acesso à variabilidade

genética em populações naturais e a comparação com linhagens de laboratório, previamente identificadas, permite ampliar o conhecimento sobre a extensão das limitações deste marcador para a identificação das espécies. O uso de marcadores moleculares alternativos para este fim também é desejável, bem como a busca por evidências que permitam melhor explicar a história da evolução mitocondrial no subgrupo *willistoni*.

Neste trabalho nós avaliamos os padrões de variação no *mtDNA* (região do *barcode*) de espécies do subgrupo *willistoni*, em amostras de populações naturais da floresta amazônica e linhagens de laboratório, discutimos os possíveis eventos que moldaram estes padrões, as implicações como um DNA *barcoding* e propomos um novo marcador nuclear como alternativa para a identificação molecular das espécies.

## Resultados

### *Rede de haplótipos*

Foram sequenciadas a *COI* de um total de 121 isolinhagens, 118 pertencentes ao subgrupo *willistoni*, sendo 108 descendentes de fêmeas recentemente coletadas e 10 sequências de linhagens de laboratório previamente identificadas. Um alinhamento de 671 bases foi gerado com 60 sítios variáveis sendo que todos os polimorfismos são silenciosos.

Uma rede haplotípica foi produzida (Fig. 1) mostrando as relações entre os haplótipos de *COI*. Quatro grupos haplotípicos foram delimitados baseados na distância genética média entre eles (>2%) e denominados haplogrupos I, II, III e IV. As distâncias médias dentro dos haplogrupos foram menores que 1%. Os haplótipos das linhagens de referência agruparam nos seguintes grupos: *D. paulistorum* Amazônica (C1) e Andino-Brasileira (C4) no haplogrupo I; *D. paulistorum* Transicional (C6), Centro-Americana (C7), Orinocana e Interior (C5) no haplogrupo II; *D. equinoxialis* (C4) no haplogrupo III e *D. willistoni* (C4), *D. tropicalis* (C3) e *D. insularis* (C9) no haplogrupo IV.

Com isso, todos os haplótipos dos haplogrupos I e II foram identificados como pertencentes a *D. paulistorum* (n = 21), enquanto que os do haplogrupo III a *D. equinoxialis* (n=69). No haplogrupo IV, encontram-se sequências referência de três espécies, *D. willistoni*, *D. tropicalis* e *D. insularis*. As linhagens que agruparam próximas a sequência de *D. tropicalis* tiveram suas identidades reconfirmadas pela análise do hipândrio. Assim foi criado um subgrupo dentro do haplogrupo IV,

denominado haplogrupo IVb, contendo haplótipos atribuídos a *D. tropicalis* (n = 4). Como *D. insularis* tem distribuição geográfica restrita a ilhas do Caribe, os demais haplótipos do haplogrupo IV foram atribuídos a *D. willistoni* (n = 24).

Compartilhamento de haplótipos ocorreu entre as semiespécies Interior e Orinocana (C5) e entre as espécies *D. willistoni* e *D. insularis* (C9).

#### *Diversidade e distância genética*

Índices de diversidade genética são mostrados na Tabela 1. A amostra com maior diversidade haplotípica foi a de *D. willistoni* ( $Hd = 0,801 \pm 0,071$ ) seguida pela de *D. paulistorum* ( $Hd = 0,743 \pm 0,083$ ). *D. equinoxialis* mostrou a mais baixa diversidade haplotípica e também nucleotídica ( $Hd = 0,115 \pm 0,052$   $\pi = 0,00026$ ). As amostras das espécies *D. tropicalis* e *D. insularis* foram excluídas das análises de diversidade molecular devido ao reduzido tamanho amostral. Nos testes de neutralidade, somente *D. willistoni* e *D. equinoxialis* apresentaram valores negativos tanto no  $D$  de Tajima quanto no  $F$  de Fu e estatisticamente significativos ( $P < 0.05$ ).

Distâncias genéticas K2P intraespecíficas e interespecíficas são mostradas na Tabela 2. Assumindo um *threshold* de somente 2%, as distâncias entre as espécies *D. willistoni*, *D. tropicalis* e *D. insularis* estariam abaixo deste percentual de corte, ou seja, seriam consideradas como pertencentes a uma mesma espécie. Já as demais espécies são discriminadas neste limiar de distância. *D. paulistorum* mostrou a maior distância genética intraespecífica, enquanto que *D. equinoxialis* mostrou a menor distância interna.

Na Tabela 3 são mostradas as distâncias genéticas K2P dentro e entre os haplogrupos. Destaque para a distância entre os haplogrupos I e II, onde ambos são compostos por haplótipos de indivíduos de *D. paulistorum* e mostram uma distância média de 4,1%. Assim, em um *threshold* de 3% estes grupos seriam considerados como espécies diferentes como observados para os valores das comparações entre o haplogrupo (I – *D. paulistorum*) com os haplogrupos III, IV (IVb) de *D. equinoxialis*, *D. willistoni* e *D. tropicalis*, respectivamente.

#### *Árvores filogenéticas*

Os modelos de substituição nucleotídica com pontuação mais baixa no Critério de Informação Bayesiana (BIC) foram o *General Time Reversible* com correção gama

(GTR + G, BIC = 3954.130) e *Tamura 3-parameter* com correção gama (T92+G, BIC = 3118.991) para as sequências de *COI* e *kl-3* respectivamente.

As árvores de Máxima Verossimilhança dos marcadores são mostradas junto dos gráficos de transição e transversão (Fig. 2). O marcador mitocondrial satura pela distância GTR próximo de 10% de divergência (Fig. 2A). As distâncias entre as espécies do subgrupo *willistoni* estão abaixo de 5%. Portanto, *COI* não satura dentro do subgrupo, mas satura para espécies do grupo externo. Já o marcador nuclear *kl-3* não mostra sinal de saturação (Fig. 2B).

Na reconstrução utilizando-se as sequências de *COI*, *D. paulistorum* mostrou-se como sendo um grupo parafilético. A linhagem mais basal é formada por um clado contendo *D. paulistorum* Andino-Brasileira e Amazônica. As sequências de *D. tropicalis*, *D. insularis* e *D. willistoni* agrupam formando um clado monofilético bem suportado (Fig. 2A). Na árvore de *kl-3* a linhagem mais basal é a de *D. insularis*. As sequências de *D. tropicalis*, *D. insularis* e *D. willistoni* são separadas e a monofilia de *D. paulistorum* é recuperada (Fig. 2B).

## Discussão

### *Complexa evolução mitocondrial*

A rede de haplótipos de *COI* e a reconstrução das relações evolutivas deste marcador em comparação com a história evolutiva de um marcador nuclear evidenciam uma complexa evolução mitocondrial no subgrupo *willistoni*. As incongruências anteriormente encontradas (Robe *et al.*, 2010) são corroboradas nas reconstruções filogenéticas da região 5' do gene *COI* e na do segmento do gene nuclear *kl-3*. A exceção é o posicionamento basal de *D. paulistorum* Andino-Brasileira formando um clado com a semiespécie Amazônica na árvore de *COI*.

Comparando os padrões de diversidade nas três espécies com um maior número amostral, *D. equinoxialis* demonstrou possuir uma diversidade genética menor em relação às suas espécies irmãs, *D. paulistorum* e *D. willistoni*. Essa reduzida diversidade haplotípica e nucleotídica em *D. equinoxialis* podem ser resultado de uma redução demográfica, “gargalo de garrafa”, ou ainda devido a uma varredura (*sweep*) por *Wolbachia*. A hipótese de redução populacional estaria bem suportada se as demais

espécies do subgrupo apresentassem diversidade reduzida, visto que elas compartilham não só uma ampla área de distribuição geográfica ao norte do Brasil, mas também sítios de alimentação e ovoposição (Valente & Araújo, 1986). Como *D. paulistorum* e *D. willistoni* mostram elevados índices de diversidade genética, a hipótese de gargalo de garrafa como possível explicação para a reduzida diversidade de *D. equinoxialis*, torna-se menos provável.

Por outro lado, as três espécies em questão foram encontradas abrigando o endossimbionte *Wolbachia*. *D. willistoni* parece ter sido infectada recentemente pela linhagem *w*Wil, pois amostras coletadas antes de 1970 não mostram sinal da infecção (Miller & Riegler, 2006). Contudo, *Wolbachia* parece não ter afetado a diversidade mitocondrial nesta espécie (Müller *et al.*, 2012). A elevada diversidade haplotípica de *COI* (Fig. 1) das amostras amazônicas, também foi documentada para *D. willistoni* em amostras do sul do Brasil, na Mata Altântida (Müller *et al.*, 2012) e no bioma Pampa (dados não publicados).

A relação do endossimbionte com *Drosophila paulistorum* é mais antiga, onde, segundo Miller *et al.* (2010) todas as semiespécies são hospedeiras de *Wolbachia* e no mínimo três diferentes variantes da bactéria, relacionadas a *w*Au, são específicas das semiespécies Orinocana, Centro-Americana e Transicional. Na semiespécie Amazônica foi encontrado uma linhagem relacionada a *w*Ri, sugerido pelos autores como uma aquisição recente via transmissão horizontal em substituição a uma linhagem mais antiga. A grande distância genética entre os haplogrupos I e II de *D. paulistorum* (Tabela 3) e o longo comprimento de ramo que leva ao clado formado pelas semiespécies Andino-Brasileira e Amazônica (Fig. 2), pode ser devido ao aumento da taxa de substituição. A aceleração da taxa de substituição nucleotídica atribuída a *Wolbachia* foi relatada para *Drosophila recens* na comparação com sua espécie irmã *Drosophila subquinaria* que não é infectada (Shoemaker *et al.*, 2004). Assim é possível que um fenômeno semelhante tenha ocorrido em *D. paulistorum*, onde uma variante de *Wolbachia* tenha acelerado a divergência na linhagem mitocondrial que levou a Amazônica e Andino-Brasileira. Contudo esta hipótese deve ser testada com a análise de outros genes mitocondriais.

A infecção por uma variante de *Wolbachia* relacionada a *w*Mel foi recentemente detectada em baixas quantidades nas isolinhagens de *D. equinoxialis* usadas neste estudo (dados não mostrados - Capítulo 3 desta Tese). A linhagem *w*Mel pode induzir diferentes níveis do fenótipo de incompatibilidade citoplasmática (Merçot & Charlat,

2004), o qual poderia levar a um aumento da quantidade de fêmeas infectadas na população em relação a fêmeas não infectadas. Como *Wolbachia* é transmitida verticalmente da mesma forma que a mitocôndria, como uma herança materna, seleção positiva atuando sobre *Wolbachia* levará também ao aumento da frequência na população da mitocôndria associada a ela, em um efeito carona. Isto pode causar a diminuição da diversidade mitocondrial, visto que fêmeas não infectadas tem menor chance de deixar descendentes, pois somente podem gerar prole de machos não infectados, enquanto que fêmeas infectadas podem se reproduzir tanto com machos infectados como não infectados (Turelli & Hoffmann, 1991). Assim a reduzida diversidade haplotípica e nucleotídica encontrada em *D. equinoxialis* pode ser em decorrência de *Wolbachia*.

O compartilhamento do haplótipo C5 (haplogrupo II) entre *D. paulistorum* Interior e *D. paulistorum* Orinocana pode estar representando a retenção de um polimorfismo ancestral considerando-se que estas semiespécies divergiram muito recentemente. Por outro lado, tal hipótese é improvável para explicar o compartilhamento do haplótipo C9 entre *D. willistoni* e *D. insularis*. Estas espécies foram as primeiras a divergirem no subgrupo *willistoni* e o compartilhamento deste haplótipo poderia ser explicado por um evento de introgressão mitocondrial. Em condições de laboratório, híbridos interespecíficos foram facilmente obtidos do cruzamento entre fêmeas de *D. insularis* e machos de *D. willistoni*, contudo todos os híbridos foram estéreis e o cruzamento recíproco raramente produziu prole (Winge, 1965). Isto não significa necessariamente que na natureza, em um contexto passado envolvendo diferentes genótipos, não possa ter ocorrido a produção de híbridos férteis, ou com algum grau de fertilidade, entre estas espécies. Fêmeas híbridas férteis retrocruzando com machos da espécie paterna poderiam introgridir a mitocôndria da espécie materna na população da espécie paterna.

#### *Identificação molecular das espécies*

Como previamente apurado por Robe *et al.* (2010) para outros marcadores mitocondriais, também a região 5' do gene *COI* falha como um DNA *barcoding* para a identificação das espécies do subgrupo *willistoni*, tanto em uma estratégia baseada em distância genética quanto em árvore filogenética. Nenhum limiar (*threshold*) pode ser delimitado no sentido de discriminar corretamente as espécies e diferentes espécies

agrupam no mesmo clado na filogenia. Marcadores nucleares podem ser mais adequados para este fim, diante da complexa história evolutiva do genoma mitocondrial observada nas espécies do subgrupo *willistoni* moldada por eventos de introgressão e diferentes infecções por *Wolbachia*.

O uso do segmento do gene *kl-3*, em uma técnica baseada em árvore filogenética, pode ser eficiente para a identificação das espécies do subgrupo *willistoni*. Este marcador é recomendado para resolver relações filogenéticas entre espécies de *Drosophila* que divergiram recentemente (Kopp *et al.*, 2006) e as relações recuperadas com este marcador para as espécies do subgrupo são as mesmas obtidas com outros genes nucleares (Gleason *et al.*, 1998; Robe *et al.*, 2010). Além disso, por estar localizado no cromossomo Y, este marcador não sofre efeito de recombinação e é bem conservado a nível intraespecífico, embora mostre diferenças interespecíficas (Carvalho comunicação pessoal, 2009). No caso das semiespécies de *D. paulistorum*, Orinocana, Interior e Andino-Brasileira compartilham um haplótipo do gene *kl-3*, enquanto Amazônica e Transicional compartilham outro. Somente Centro-Americana mostrou um haplótipo exclusivo. Portanto, mesmo apresentando polimorfismos intraespecíficos, a retenção de polimorfismo ancestral neste marcador impede que ele possa ser usado unicamente para a identificação das semiespécies de *D. paulistorum*.

## **Procedimentos experimentais**

### *Amostragem dos táxons*

Foram coletados espécimes de *Drosophila* dentro de uma região de simpatria na floresta Amazônica de quatro espécies do subgrupo *willistoni* (*D. willistoni*, *D. paulistorum*, *D. equinoxialis* e *D. tropicalis*) no Estado do Pará, norte do Brasil, especificamente na Floresta Nacional do Tapajós, Belterra (2°47'58.873"S / 54°54'0.850"W) e na Fazenda Taperinha, Santarém (2°26'21.967"S / 54°41'55.446"W) em maio de 2011. As moscas foram capturadas usando rede entomológica e armadilhas de garrafa PET (Tidon & Sene, 1988) contendo banana e fermento biológico.

As amostras foram analisadas no laboratório com um estereoscópio, e as fêmeas pertencentes ao subgrupo *willistoni* foram separadas e dispostas em meio com farinha de milho e levedura (Marques *et al.*, 1966), a fim de estabelecer isolinhagens. Estas isolinhagens foram codificadas e mantidas em uma câmara de demanda bioquímica de



oxigênio (BOD) a 22 ° C em um fotoperíodo de 12/12 h (claro/escuro), sendo o meio de cultura substituído semanalmente.

Foram adicionadas à amostragem de campo, linhagens de laboratório de cada uma das espécies e semiespécies do subgrupo *willistoni*, identificadas pelos métodos taxonômicos tradicionais. São elas: *D. willistoni* Gd-H4 (Guadeloupe – Pequenas Antilhas, 12 Genomes Consortium, Clark *et al.*, 2007), *D. paulistorum* Andino-Brasileira (Morro da Lagoa da Conceição, Florianópolis – Brasil), *D. paulistorum* Amazônica (Belém – Brasil), *D. paulistorum* Orinocana (Georgetown – Guiana), *D. paulistorum* Interior (Llanos – Colômbia), *D. paulistorum* Transicional (Santa Marta – Colômbia), *D. paulistorum* Centro-Americana (Lancetilla – Honduras), *D. tropicalis* (linhagem 0801, San Salvador – El Salvador), *D. equinoxialis* (Apazapan – México) e *D. insularis* (linhagem SI-3 – Santa Lúcia). As sequências obtidas destas linhagens funcionam como referência para a identificação das sequências obtidas das amostras de populações naturais. Quando necessário, para testar se a identificação da espécie pelo marcador molecular estava correta, a identidade foi reconfirmada pela análise da terminália do macho, comparando o formato do hipândrio e epândrio aos descritos por Malogolowkin (1952) e Spassky (1957).

#### *Procedimentos de biologia molecular*

O DNA dos espécimes foi extraído pelo método de coluna com o Kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Germany) seguindo as instruções do fabricante.

Todas as reações de PCR foram feitas em um volume de 25 µl usando 1-2 µl de DNA total com 12.5 µl PCR *Master Mix* 2X (Fermentas, Lithuania) (0.05U/µl *Taq* DNA polimerase, 10X *buffer*, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM of each dNTP), 1 µl de cada *primer* (20 µM each) e água ultrapura para completar o volume final.

Os *primers* TY-J-1460 5'-TACAATCTATCGCCTAAACTTCAGCC-3' e C1-N-2329 5'- ACTGTAAATATATGATGAGCTCA-3' (Simon *et al.*, 1994) foram usados para amplificar um fragmento de aproximadamente 950 pb do gene mitocondrial *Citocromo Oxidase subunidade I (COI)* que se sobrepõe com a região recomendada para DNA *barcoding*. Os ciclos de temperatura foram: 5 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 40 s, 55 °C por 40 s e 72 °C por 1 min, com uma extensão final de 3 min a 72 °C.

Os *primers* KI-3Y\_F 5'-AGCCAGGCGTTCAGTAACAC-3' e KI-3Y\_R 5'-GATGCCATTGCTACAGTTGACTT-3', foram desenhados no programa online Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) tendo como base a sequência de cDNA, depositada para *D. willistoni*, do gene nuclear *fator de fertilidade do macho (kl-3)* que codifica uma proteína dineína de cadeia pesada (Carvalho *et al.*, 2000). Estes *primers* foram usados para amplificar, no DNA proveniente de machos, um segmento de 624 pb com as seguintes condições de ciclagem: 3 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 1 min, 60 °C por 1 min e 72 °C por 1 min e 30 s, com uma extensão final de 5 min a 72 °C.

Todos os produtos de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio e visualizados sobre um transluminador ultravioleta. Os amplicons foram submetidos para purificação e sequenciamento direto na Macrogen (Macrogen Inc., Seoul, Korea). Cada amplicon foi sequenciado com ambos os *primers*.

#### *Análises de bioinformática*

O cromatograma das sequências foi inspecionado no programa Chromas Pro 1.5 (<http://www.technelysium.com.au>) e a edição realizada no BioEdit (Hall, 1999). As sequências foram alinhadas com o algoritmo ClustalW (Higgins *et al.*, 1994) incorporado no programa Mega 5 (Tamura *et al.*, 2011). Sequências consenso foram geradas baseadas em no mínimo dois sequenciamentos independentes.

O alinhamento de todas as sequências consenso de *COI* foi analisado usando o programa DnaSP 5.19 (Librado & Rozas, 2009) para calcular a diversidade nucleotídica e haplotípica. Testes de neutralidade foram executados usando o programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). Uma rede de haplótipos de *COI* foi desenhada no programa Network (Bandelt *et al.*, 1999) com base no algoritmo de *median-joining*. As distâncias genéticas dentro e entre os grupos haplotípicos e as espécies foram estimadas no programa Mega usando a distância de Kimura 2-parâmetros (K2P) (Kimura, 1980).

Os conjuntos de sequências alinhadas de cada marcador foram individualmente testados para saturação no DAMBE 4.5.22 (Xia & Xie, 2001). O nível de saturação das sequências foi avaliado através da análise gráfica do número de transições e transversões (ti/tv) versus a distância genética corrigida segundo o modelo predito de evolução da sequência.

Para as análises filogenéticas foram usadas somente uma sequência de cada marcador (*COI* e *kl-3*) para representar cada espécie, com exceção de *D. paulistorum*

que teve sequências de ambos os marcadores para cada semiespécie. Foram ainda adicionadas sequências de três espécies para servir como grupo externo: *D. fummipennis* (Joinville – Brasil), *D. capricorni* e *D. stutervanti*. As reconstruções filogenéticas de cada marcador foram conduzidas no Mega 5 pelo método de Máxima Verossimilhança. Os modelos de substituição nucleotídica foram escolhidos com base na pontuação mais baixa no Critério de Informação Bayesiana (BIC) comparados os valores de 24 diferentes modelos. O método de busca heurística utilizado é o *Nearest-Neighbor-Interchange* (NNI). O suporte dos ramos foi testado com 1000 replicações de *bootstrap*.

### Agradecimentos

Nós somos gratos ao Dr. Antonio Bernardo de Carvalho pela ajuda no desenvolvimento de *primers* para o gene *kl-3* e a Dra. Juliana Cordeiro pelas discussões e sugestões na forma de apresentação deste artigo. Agradecemos também ao Dr. Jeffrey Powell pelo envio de espécimes de *D. insularis* e à Dra. Marlúcia B. Martins (Museu Paraense Emílio Goeldi – MPEG) por providenciar a autorização legal e logística para a realização das coletas na Floresta Nacional do Tapajós e na Fazenda Taperinha – PA. Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq, CNPq (processo 480306/2012-5), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES, PRONEX-FAPERGS (10/0028-7) e pela Universidade do Vale do Rio dos Sinos/UNISINOS.

### Referências

- Alexander, L.C., Delion, M., Hawthorne, D.J., Lamp, W.O. and Funk, D.H. (2009) Mitochondrial lineages and DNA barcoding of closely related species in the mayfly genus *Ephemerella* (Ephemeroptera:Ephemerellidae). *Journal of the North American Benthological Society* **28**: 584–595.
- Bandelt, H.J., Forster, P. and Rohlf, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 37–48.
- Carvalho, A.B., Lazzaro, B.P., and Clark, A.G. (2000) Y chromosomal fertility factors *kl-2* and *kl-3* of *Drosophila melanogaster* encode dynein heavy chain polypeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 13239–13244.

Dobzhansky, Th. 1957. Genetics of natural populations. XXVI. Chromosomal variability in island and continental populations of *Drosophila willistoni* from Central America and west Indies. *Evolution* **11**: 280-293.

Dobzhansky, Th. and Spassky, B. (1959) *Drosophila paulistorum*, a cluster of species in statu nascendi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **45**: 419–428.

Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**: 47–50.

Gleason, J.M., Griffith, E.C. and Powell, J.R. (1998) A molecular phylogeny of the *Drosophila willistoni* group: conflicts between species concepts? *Evolution* **52**: 1093–1103.

Haldane, J.B.S. 1922. Sex-ratio and unidirectional sterility in hybrid animals. *J. Genet.* **12**: 101-109.

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

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and DeWaard, J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc B* **270**: 313–321.

Higgins D., Thompson J., Gibson T. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673–4680.

Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**:111–120.

Kopp, A., Frank, A.K. and Barmina, O. (2006) Interspecific divergence, intrachromosomal recombination, and phylogenetic utility of Y-chromosomal genes in *Drosophila*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **38**: 731–741.

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

Malogolowkin, C. (1952) Sôbre a genitália dos "Drosophilidae" (Diptera). III. Grupo *willistoni* do gênero *Drosophila*. *Rev. Bras. Biol.* **12**: 79–96.

Marques, E.K., Napp, M., Winge, H. and Cordeiro, A.R. (1966) A corn meal, soybean flour, wheat germ medium for *Drosophila*. *Drosophila Inf. Serv.* **41**: 187.

Merçot, H., Charlat, S. (2004) *Wolbachia* infections in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: polymorphism and levels of cytoplasmic incompatibility. *Genetica* **120**: 51–59.

Pérez-Salas, S., Richmond, R.C., Pavlovsky, O.A., Kastritsis, C.D., Ehrman, L. and Dobzhansky, T. (1970) The interior semispecies of *Drosophila paulistorum*. *Evolution* **24**:519–527.

Yassin, A., Capy, P., Madi-Ravazzi, L., Ogereau, D. and David, J.R. (2008) DNA barcode discovers two cryptic species and two geographical radiations in the invasive drosophilid *Zaprionus indianus*. *Mol Ecol Resour* **8**: 491–501.

Yassin, A., Markow, T. A., Narechania, A., O'Grady, P. M. and DeSalle, R. (2010) The genus *Drosophila* as a model for testing tree- and character-based methods of species identification using DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **57**: 509–517.

Robe, L.J., Cordeiro, J., Loreto, E.L. and Valente, V.L. (2010). Taxonomic boundaries, phylogenetic relationships and biogeography of the *Drosophila willistoni* subgroup (Diptera: Drosophilidae). *Genetica* **138**: 601–617.

Sbordoni, V. (2010) Strength and limitations of DNA barcode under the multidimensional species perspective. *Tools for Identifying Biodiversity: Progress and Problems*: 275–280.

Shoemaker, D.D., Dyer, K.A., Ahrens, M., McAbee, K. and Jaenike, J. (2004). Decreased Diversity but Increased Substitution Rate in Host mtDNA as a Consequence of *Wolbachia* Endosymbiont Infection. *Genetics* **168**: 2049–2058.

Spassky, B. (1957) Morphological differences between sibling species of *Drosophila*. *Genetics of Drosophila* **5721**: 48–61.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731–2739.

Tidon, R. and Sene, F.M. (1988) A trap that retains and Keeps *Drosophila* alive. *Drosophila Information Service* **67**: 90.

Turelli, M. and Hoffmann, A.A. (1991) Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila*. *Nature* **353**: 440–442.

Rozen, S. and Skaletsky, H.J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365–386.

Winge, H. (1965) Interspecific hybridisation between the six cryptic species of *Drosophila willistoni* group. *Heredity* **20**: 9–19.

Xia, X. and Xie, Z. (2001) DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered* **92**: 371–373.

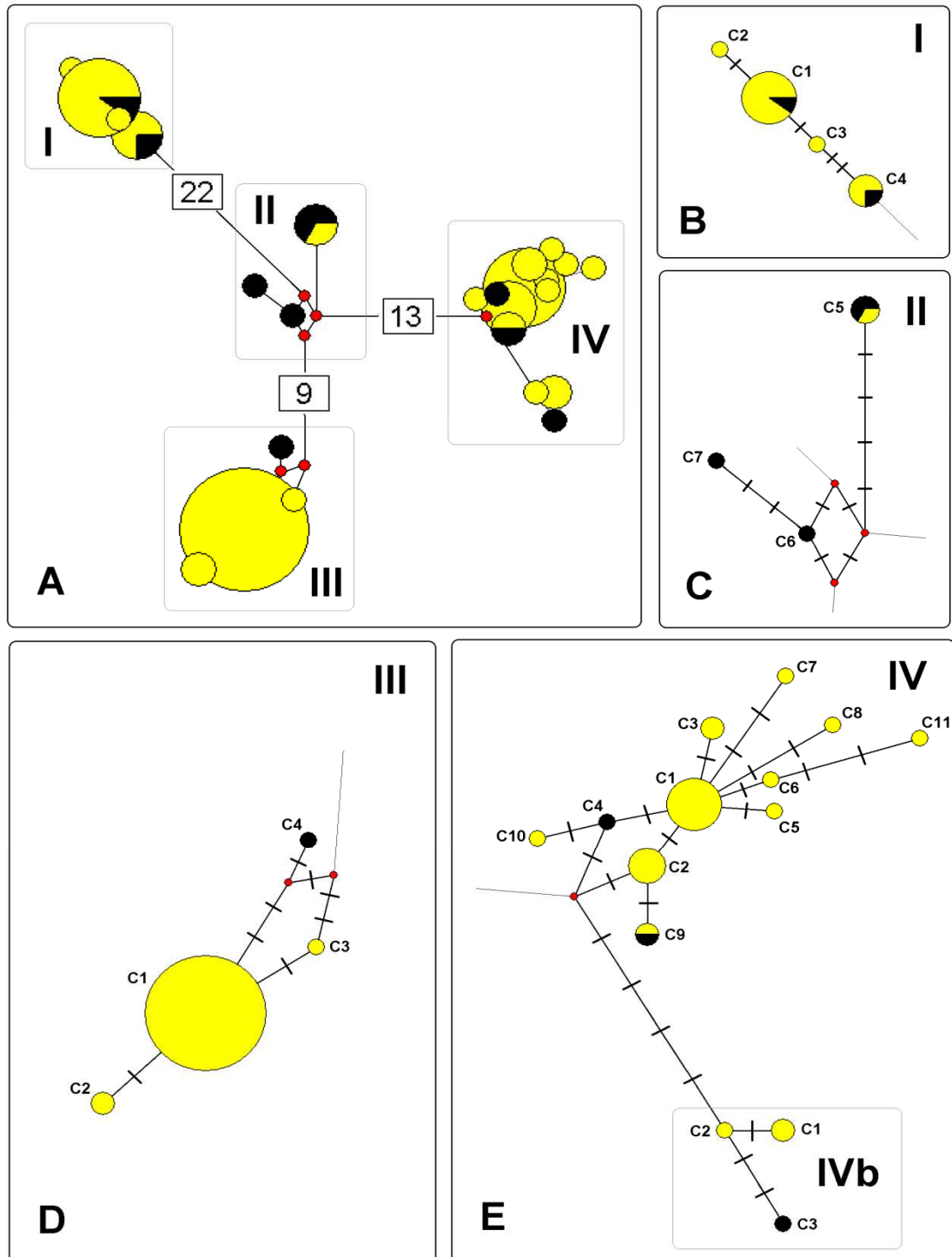


Figura 1. (A) *Median-joining Network* do marcador da *citocromo oxidase subunidade I* (*COI*) das amostras do subgrupo *willistoni*. Quatro haplogrupos são indicados (I,II,III e IV). Número dentro dos quadrados indica o número de passos mutacionais entre os grupos. Vetores médios representados por pequenos círculos em vermelho. Círculos amarelos representam diferentes haplótipos de *COI* sendo o diâmetro proporcional a frequência. Círculos total ou parcialmente em preto indicam haplótipos obtidos das linhagens de laboratório. (B,C,D e E) Detalhes das relações entre os haplótipos em cada haplogrupo. Barras perpendiculares nas retas que conectam os haplótipos representam passos mutacionais.

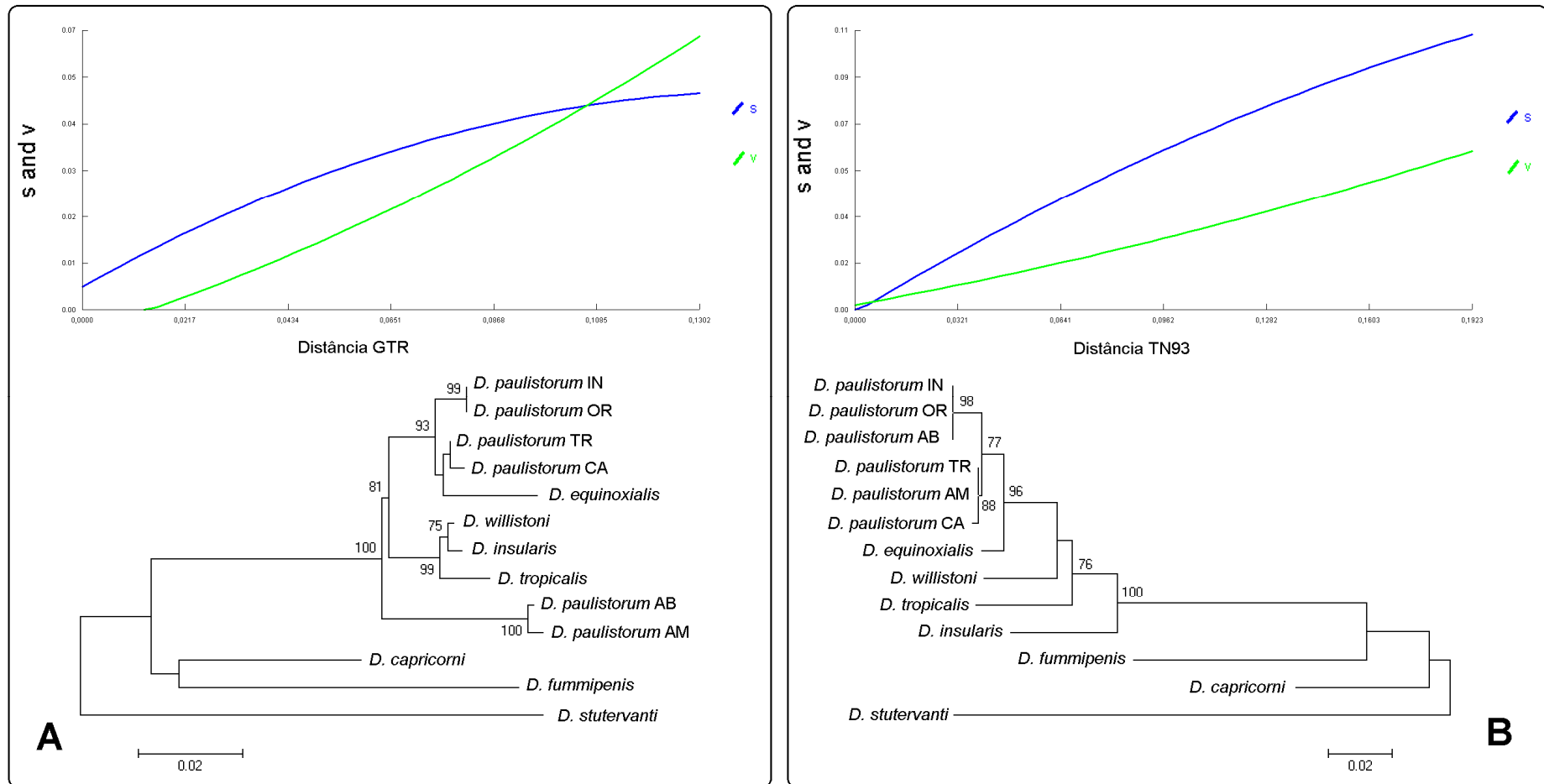


Figura 2. Árvores filogenéticas de Máxima Verossimilhança obtidas com os dados (A) do gene mitocondrial *COI* e (B) do gene nuclear *kl-3*. Apenas os valores de suporte de *bootstrap* iguais ou maiores que 75% são mostrados para cada clado. Acima das árvores os gráficos de saturação para cada partição de dados.

Tabela 1. Número de indivíduos, haplótipos por espécie, índices de diversidade genética e testes de neutralidade.

Espécie	<i>n</i>	Haplótipos de <i>COI</i>	Diversidade Haplótica ( <i>Hd</i> ) e <i>DP</i>	Diversidade nucleotídica ( $\pi$ )	<i>D</i> de Tajima <i>P</i>	<i>F</i> de Fu <i>P</i>
<i>D. equinoxialis</i>	68	4	0,115 ± 0,052	0,00026	-1.89632 <i>P</i> = 0.00100	-3.11772 <i>P</i> = 0.00500
<i>D. willistoni</i>	24	11	0,801 ± 0,071	0,00229	-1.79063 <i>P</i> = 0.02600	-6.75423 <i>P</i> = 0.00000
<i>D. paulistorum</i>	21	7	0,743 ± 0,083	0,01675	1.18225 n/s	5.79428 n/s
<i>D. tropicalis</i>	4	3	_*	_*	_*	_*
<i>D. insularis</i>	1	1	_*	_*	_*	_*

*n* = número de indivíduos

*DP* = desvio padrão

*P* = probabilidade

n/s = *p*-valor não significativo

\* = excluído da análise de diversidade molecular devido ao reduzido tamanho amostral.



Tabela 2. Distâncias genéticas K2P intraespecíficas e interespecíficas.

<b>Espécie</b>	<b>Dist. Intraespecífica e erro padrão</b>	<b>Espécies</b>	<b>Dist. Interespecífica e erro padrão</b>
<i>D. willistoni</i>	0,0023 ± 0,0007	<i>D. willistoni</i> X <i>D. equinoxialis</i>	0,035 ± 0,007
		<i>D. willistoni</i> X <i>D. paulistorum</i>	0,038 ± 0,006
		<i>D. willistoni</i> X <i>D. tropicalis</i>	0,011 ± 0,003
		<i>D. willistoni</i> X <i>D. insularis</i>	0,003 ± 0,002
<i>D. equinoxialis</i>	0,0003 ± 0,0001	<i>D. equinoxialis</i> X <i>D. paulistorum</i>	0,041 ± 0,007
		<i>D. equinoxialis</i> X <i>D. tropicalis</i>	0,038 ± 0,007
		<i>D. equinoxialis</i> X <i>D. insularis</i>	0,032 ± 0,007
<i>D. paulistorum</i>	0,0173 ± 0,0030	<i>D. paulistorum</i> X <i>D. tropicalis</i>	0,042 ± 0,006
		<i>D. paulistorum</i> X <i>D. insularis</i>	0,038 ± 0,006
<i>D. tropicalis</i>	0,0025 ± 0,0014	<i>D. tropicalis</i> X <i>D. insularis</i>	0,011 ± 0,004
<i>D. insularis</i>	-	-	-

Tabela 3. Distâncias genéticas K2P dentro e entre os haplogrupos.

Haplogrupo	Dist. Intragrupo e erro padrão	Haplogrupos	Dist. Intergrupo e erro padrão
<b>I</b>	0,0021 ± 0,0010	<b>I x II</b>	0,041 ± 0,007
		<b>I x III</b>	0,046 ± 0,008
		<b>I x IV</b>	0,042 ± 0,007
<b>II</b>	0,0066 ± 0,0024	<b>II x III</b>	0,022 ± 0,005
		<b>II x IV</b>	0,029 ± 0,006
<b>III</b>	0,0003 ± 0,0001	<b>III x IV</b>	0,035 ± 0,007
<b>IV</b>	0,0044 ± 0,0012	-	-

## CAPÍTULO 5

### III – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os achados obtidos no presente estudo são relevantes, pois são os primeiros obtidos diretamente de populações naturais. As linhagens de laboratório foram usadas como material de referência, previamente identificado por métodos taxonômicos convencionais.

No primeiro estudo publicado desta tese (capítulo 2, Müller *et al.*, 2012), usando somente a PCR do gene *wsp* foi detectado infecção por *Wolbachia* em 55% da amostra de *D. willistoni* coletada na Mata Altântida, sul do Brasil. Este resultado difere do encontrado por Miller & Riegler (2006), que detectaram *Wolbachia* em todas as linhagens continentais coletadas do México ao Uruguai nos anos de 1990 e após. Vale salientar que além de *wsp*-PCR, o trabalho contou com diagnóstico por *Southern hybridization*. Assim os autores assumiram que *Wolbachia* está fixada nas populações continentais de *D. willistoni*.

No segundo artigo da tese (capítulo 3), todas as isolinhagens de *D. willistoni*, descendentes de indivíduos coletados na Floresta Amazônica foram positivas para *Wolbachia* no *screening* com *Dot-blot*, enquanto que 65% delas foram positivas na *wsp*-PCR. Isto revela uma alta quantidade de falsos negativos gerados pela PCR padrão, um problema já reportado anteriormente (Jeyaprakash & Hoy, 2000). Esta situação pode decorrer da interferência do DNA do hospedeiro, mas também tem sido relatada nos casos de baixa infecção nos tecidos (Miller *et al.*, 2010). As amostras que não amplificaram na *wsp*-PCR foram na sua maioria aquelas que mostraram intensidade de sinal mais fraco no autoradiograma do *Dot-blot*. Estes dois resultados sugerem diferentes níveis de infecção, tanto entre isolinhagens da mesma espécie quanto entre espécies diferentes.

A caracterização molecular de *Wolbachia* pela sequência do gene *wsp* e pelo tamanho do VNTR-141, revelou que a infecção *wWil* está presente em amostras de populações de *D. willistoni* tanto do norte quanto do sul do Brasil. Múltiplos eventos de transmissão horizontal, sugeridos pela associação de *wWil* a diferentes haplótipos mitocôndrias (Müller *et al.*, 2012), podem explicar a rápida propagação desta infecção nas populações continentais. As isolinhagens de *D. willistoni* que mostraram menor intensidade de sinal no *Dot*, não puderam

ser caracterizadas. Não é possível afirmar que estas isolinhagens estão infectadas pela mesma variante de *Wolbachia*. Elas podem estar infectadas por uma linhagem diferente, apresentar uma coinfeção ou ainda ter *Wolbachia* matida em baixa densidade devido a uma resposta imune do hospedeiro. Esta situação permanece por ser elucidada.

Este estudo foi o primeiro a detectar linhagens de *D. equinoxialis* infectadas por *Wolbachia*. Amostras desta espécie foram negativas em *screenings* anteriores (Miller & Riegler, 2006; Mateos *et al.*, 2006). Foi possível amplificar e sequenciar o segmento do gene *wsp* de três isolinhagens desta espécie e todas mostraram uma sequência com 100% de similaridade com a depositada para a linhagem *wMel*, de *D. melanogaster*. A linhagem *wMel* pode induzir incompatibilidade citoplasmática em diferentes níveis (Merçot & Charlat, 2004). Também uma linhagem de laboratório de *D. paulistorum* Amazônica mostrou infecção por uma variante *wMel-like*.

Em *D. tropicalis* foi caracterizada a infecção pela linhagem *wAu*, de *D. simulans*, pela amplificação e sequenciamento do marcador *VNTR-141*. Mateos *et al.* (2006) classificou a infecção detectada em amostras desta espécie como sendo *wWil*, entretanto os marcadores usados, 16S rDNA e *wsp*, não discriminam entre as variantes *wWil* e *wAu*. Foi sugerido que a infecção *wAu* tem origem neotropical e que por ser filogeneticamente relacionada a *wWil* de *D. willistoni*, esta última teria sido a espécie doadora de uma infecção *wAu-like* para *D. simulans* (Miller & Riegler). Todavia, agora com a detecção de *wAu* em *D. tropicalis*, esta espécie torna-se melhor candidata a doadora da infecção do que *D. willistoni*. Sendo assim, a infecção *wAu* não só tem origem neotropical como também evoluiu dentro do subgrupo *willistoni*. Como a infecção *wWil* em *D. willistoni* é considerada recente (Miller & Riegler, 2006), *wAu* tende a ser a linhagem ancestral.

Estes achados de uma variante *wMel-like* em *D. equinoxialis* e *D. paulistorum* Amazônica e da linhagem *wAu* em *D. tropicalis*, são evidências de eventos de transmissão horizontal de *Wolbachia* envolvendo espécies de *Drosophila* do velho mundo e espécies neotropicais. A linhagem *wMel* é a mais frequente em populações de *D. melanogaster* (Nunes *et al.*, 2008), porém também foi encontrada em *D. simulans* (Mateos *et al.*, 2006). Contudo, do ponto de vista ecológico, *D. simulans* é melhor candidata a doadora de uma infecção *wMel-like* para as espécies neotropicais. Enquanto *D. melanogaster* é uma espécie mais associada a

ambientes domésticos (Keller, 2007), *D. simulans* é mais selvagem não estando restrita a ambientes urbanos e sendo encontrada também em ambientes de savana (Sene et al., 1980; Ferreira and Tidon, 2005). Além disso, espécies mais generalistas como do grupo *willistoni* ocorrem simpatricamente com populações de *D. simulans* e compartilham os mesmos sítios de ovoposição (Valente & Araújo, 1986; Valiati & Valente, 1996).

No último trabalho que compõe esta tese (capítulo 4), foi avaliado os padrões de diversidade do *mtDNA* de espécies do subgrupo *willistoni*, tanto com linhagens recentemente coletadas quanto com linhagens de laboratório. As incongruências relatadas por Robe *et al.* (2010) também foram recuperadas nas reconstruções filogenéticas com a porção 5' do gene mitocondrial *COI* e com um segmento do gene nuclear *kl-3*, com exceção do posicionamento de *D. paulistorum* Andino-Brasileira na árvore de *COI*. Foi encontrado o compartilhamento de um haplótipo entre uma linhagem de *D. willistoni*, proveniente da Amazônia, e de uma linhagem de laboratório de *D. insularis*. Este achado constitui uma clara evidência de introgessão da mitocôndria, visto que as linhagens das espécies em questão foram as primeiras a divergir no subgrupo *willistoni* (Robe *et al.*, 2010). Não está descartado efeitos da associação com diferentes linhagens de *Wolbachia*, que entre outras coisas pode ter acelerado a taxa de substituição nucleotídica na linhagem que leva a um clado formado pelas semiespécies Amazônica e Andino-Brasileira de *D. paulistorum* ou ainda diminuído a diversidade mitocondrial em *D. equinoxialis*. Todavia, não foram encontradas evidências definitivas que possam estabelecer o real papel de *Wolbachia* na evolução das linhagens mitocondriais no subgrupo *willistoni*. Novos trabalhos são necessários para elucidar esta questão.

Devido a complexa história evolutiva do genoma mitocondrial, as distâncias genéticas de *COI* não podem ser usadas para separar corretamente as espécies do subgrupo *willistoni*. Marcadores nucleares terão que ser utilizados para este fim. É proposto o uso de sequências do cromossomo Y de *Drosophila*, especificamente do gene *kl-3*, para a identificação molecular destas espécies.

## PERSPECTIVAS

Como forma de continuação deste trabalho, delineamos algumas perspectivas e análises a serem empregadas com a finalidade de investigar os aspectos que não foram totalmente elucidados nesta tese. São elas:

- Avaliar possíveis distorções na razão sexual em linhagens de *D. equinoxialis* infectadas pela variante *wMel-like*;
- Otimizar a amplificação dos marcadores de *Wolbachia* com *Long PCR* e *Nested PCR*;
- Clonar amplicons de marcadores tradicionais, *MLST* e *VNTR* para uma caracterização molecular mais apurada;
- Quantificar por PCR em tempo real (qPCR) *Wolbachia* entre diferentes linhagens da mesma espécie e entre as diferentes espécies do subgrupo *willistoni*;
- Fazer tratamento com antibióticos (tetraciclina e rifampicina), no sentido de obter linhagens de *Drosophila* livres da infecção;
- Realizar cruzamentos interespecíficos entre linhagens tratadas e não tratadas com antibiótico;
- Avaliar a localização nos tecidos e tropismo no embrião da variante *wMel-like* em *D. equinoxialis* com a técnica de microscopia de imunofluorescência;
- Iniciar experimentos de transfecção de *Wolbachia*.
- Executar *screenings* para o endossimbionte *Spiroplasma* nas espécies do subgrupo *willistoni*.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Anderson CL and Karr TL (2001) *Wolbachia*: Evolutionary novelty in a rickettsial bacteria. BMC Evolutionary Biology 1: 10.
- Ayala FJ and Powell JR (1972) Allozymes as diagnostic character of sibling species of *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA 69: 1094-1096.
- Ayala FJ, Tracey JR, Mourao C and Pérez-Salas S (1972) Enzyme variability in *Drosophila willistoni* group, IV: Genetic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. Genetics 70: 113-139.
- Bächli G, Vilela CR, Escher AS and Saura A (2004) The Drosophilidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. Fauna Entomol Scand 39: 1-362.
- Baldo L, Lo N and Werren JH (2005) Mosaic nature of the *Wolbachia surface protein*. J Bacteriol 187: 5406-5418.
- Baldo L, Hotopp JCD, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MCJ, Tettelin H and Werren JH (2006) Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. Appl Environ Microbiol 72: 7098-7110.
- Baldo L and Werren JH (2007) Revisiting *Wolbachia* supergroup typing based on *wsp*: spurious lineages and discordance with MLST. Curr. Microbiol. 55: 81-87.
- Baldo L, Prendini L, Corthals A and Werren JH (2007) *Wolbachia* are present in southern African scorpions and cluster with supergroup F. Curr Microbiol 55(5): 367-373.
- Ballard JWO (2004) Sequential evolution of a symbiont inferred from the host: *Wolbachia* and *Drosophila simulans*. Mol Biol Evol 21: 428-442.
- Bandi C, Anderson TJ, Genchi C and Blaxter ML (1998) Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. Proc Biol Sci 265: 2407-2413.
- Bordenstein S and Rosengaus RB (2005) Discovery of a novel *Wolbachia* supergroup in Isoptera. Curr Microbiol 51: 393-398.
- Bouchon D, Cordaux R and Grève P (2008) Feminizing *Wolbachia* and the evolution of sex determination in isopods. Insect Symbiosis 3:273-294.
- Bourtzis K, Nirgianaki A, Markakis G, Savakis C (1996) *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. Genetics 144: 1063-1073.

Breeuwer JA, Stouthamer R, Barns SM, Pelletier DA, Weisburg WG and Werren JH (1992) Phylogeny of cytoplasmic incompatibility micro-organisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. *Insect Mol Biol* 1: 25-36.

Burla H, da Cunha AB, Cordeiro AR, Dobzhansky T and Pavan C (1949) The *willistoni* group of sibling species of *Drosophila*. *Evolution* 4: 300-314.

Casiraghi M, Bordenstein SR, Baldo L, Lo N, Beninati T, Wernegreen JJ, Werren JH and Bandi C (2005) Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. *Microbiology* 151: 4015-4022.

Casiraghi M, Ferri E and Bandi C (2007) *Wolbachia*: evolutionary significance in nematodes. In: Hoerauf A and Rao RU (eds.) *Wolbachia* v.5. *Issues Infect Dis*. Basel, Karger, pp 15-30.

Casper-Lindley C, Kimura S, Saxton DS, Essaw Y, Simpson I, Tan V and Sullivan W (2011) Rapid fluorescence-based screening for *Wolbachia* endosymbionts in *Drosophila* germ line and somatic tissues. *Appl Environ Microbiol* 77: 4788-4794.

Clancy DJ and Hoffmann AA (1996) Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: evolving complexity. *Trends Ecol Evol* 11:145-146.

Clark ME (2007) *Wolbachia* symbiosis in arthropods. In: Hoerauf A and Rao RU (eds.) *Wolbachia* v. 5. *Issues Infect Dis*. Basel, Karger, pp 90-123.

Clark ME, Anderson CL, Cande J and Karr TL (2005) Widespread prevalence of *Wolbachia* in laboratory stocks and the implications for *Drosophila* research. *Genetics* 170: 1667-1675.

Cordeiro AR and Winge H (1995) Levels of evolutionary divergence of *Drosophila willistoni* sibling species. In: Levine L (ed.) *Genetics of Natural Populations: The Continuing Importance of Theodosius Dobzhansky*. Columbia University Press, New York, pp 262-280.

Crespigny FEC and Wedell N (2007) Mate preferences in *Drosophila* infected with *Wolbachia*? *Behav Ecol Sociobiol* 61:1229-1235.

Czarnetzki AB and Tebbe CC (2004) Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in Collembola. *Environ Microbiol* 6(1): 35-44.

Dean MD (2006) A *Wolbachia*-associated fitness benefit depends on genetic background in *Drosophila simulans*. *Proc Biol Sci* 273: 1415-1420.

Dean MD, Ballard KJ, Glass A and Ballard JWO (2003) Influence of two *Wolbachia* strains



on population structure of east African *Drosophila simulans*. *Genetics* 165: 1959-1969.

Dobson SL, Bourtzis K, Braig HR, Jones BF, Zhou W, Rousset F and O'Neill SL (1999) *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochem Mol Biol* 29: 153-160.

Dobzhansky T (1957) Genetics of natural populations. XXVI. Chromosomal variability in island and continental populations of *Drosophila willistoni* from Central America and West Indies. *Evolution* 11: 280-293.

Dobzhansky T and Powell JR (1975) The *willistoni* group of the sibling species of *Drosophila*. In: King RC (ed.) *Handbook of Genetics*. Plenum, New York, pp 589-622.

Dobzhansky T and Spassky B (1959) *Drosophila paulistorum*, a cluster of species in *statu nascenti*. *Proc Natl Acad Sci* 45: 419-428.

Dobzhansky T, Burla H and da Cunha AB (1950) A comparative study of chromosomal polymorphism in sibling species of the *willistoni* group of *Drosophila*. *Amer Nat* 84: 229-246.

Dobzhansky T, Ehrman L and Pavlovsky O (1957) Genetics of *Drosophila*. IX: *Drosophila insularis*, a new sibling species of *willistoni* group. *Univ Texas Publ* 5712: 39-47.

Ebbert M (1991) The interaction phenotype in the *Drosophila willistoni* – *Spiroplasma* symbiosis. *Evolution* 45: 971-988.

Ehrman L (1968) Antibiotics and infectious hybrid sterility in *Drosophila paulistorum*. *Mol Gen Genet* 103: 218-222.

Ehrman L and Kernaghan RP (1972) Infectious heredity in *Drosophila paulistorum*. In: Ciba Foundation Symposium, Pathogenic Mycoplasmas. Assoc Scientific Publishers, Amsterdam, pp 227-250.

Ehrman L and Powell JR (1982) *Drosophila willistoni* species group. In: Ashburner M, Carson HL and Thompson JR (eds.) *The genetics and biology of Drosophila* v. 3b. Academic Press, New York, pp 193-225.

Ehrman L and Ramos L (1973) Failures so far, to grow mycoplasmas or mycoplasma-like organisms from infected insects. *Intern Res Comm Sys* 25.

Ehrman L, Perelle I and Factor JR (1995) Endosymbiotic infectivity. In: Levene L (ed.) *Genetics of natural populations: The continuing importance of Theodosius Dobzhansky*. Columbia University Press, New York, pp 241-261.

Ferreira LB and Tidon R (2005) Colonizing potential of Drosophilidae (Insecta, Diptera) in environments with different grades of urbanization. *Biodivers. Conserv.* 14: 1809-1821.

Ferri E, Bain O, Barbuto M, Martin C, Lo N, Uni S, Landmann F, Baccei SG, Guerrero R, de Souza Lima S, Bandi C, Wanji S, Diagne M and Casiraghi M (2011) New Insights into the Evolution of *Wolbachia* Infections in Filarial Nematodes Inferred from a Large Range of Screened Species. *PLoS ONE* 6.

Garcia ACL, Rohde C, Audino GF, Valente VLS and Valiati VH (2006) Identification of the sibling species of the *Drosophila willistoni* subgroup through the electrophoretic mobility of acid phosphatase-1. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 44: pp 212-216.

Gleason JM, Griffith EC and Powell JR (1998) A molecular phylogeny of the *Drosophila willistoni* group: conflicts between species concepts? *Evolution* 52: 1093-1103.

Gottlieb Y, Zchori-Fein E, Werren JH and Karr TL (2002) Diploidy restoration in *Wolbachia*-infected *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). *J Invertebr Pathol* 81: 166-174.

Hedges LM, Brownlie JC, O'Neill SL and Johnson KN (2008) *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science* 322:702.

Hertig M (1936) The rickettsia *Wolbachia pipientis* (gen. et. sp. n) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitology* 28: 453-486.

Hertig M and Wolbach SB (1924) Studies on *Rickettsia*-like micro-organisms in insects. *J Med Res* 44 (3): 329-374.

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

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

Hoffmann AA and Turelli M (1997) *Cytoplasmic incompatibility in insects*. Oxford University Press, Oxford, pp 42-80.

Hoffmann AA, Clancy DJ and Merton E (1994) Cytoplasmic incompatibility in Australian populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 136, 993-999.

Holden PR, Brookfield JFY and Jones P (1993) Cloning and characterization of an *ftsZ* homologue from a bacterial symbiont of *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* 240: 213-

220.

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

Ilinsky Y (2013) Coevolution of *Drosophila melanogaster* mtDNA and *Wolbachia* Genotypes. *PLoS One* 8: 1.

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

Jiggins FM, Von Der Schulenburg JH, Hurst GD and Majerus ME (2001) Recombination confounds interpretations of *Wolbachia* evolution. *Proc Biol Sci* 268: 1423-1427.

Jolley KA, Chan MS and Maiden MCJ (2004) mlstdbNet – distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics* 5: 79-86.

Keller A (2007) *Drosophila melanogaster*'s history as a human commensal. *Current Biol.* 17: 77-81.

Kastritsis CD and Dobzhansky T (1967) *Drosophila pavlovskiana*, a race or a species? *Am Midl Natur* 78: 244-248.

Keiser PB, Coulibaly Y, Kubofcik J, Diallo AA, Klion AD, Traoré SF and Nutman TB (2008) Molecular identification of *Wolbachia* from the filarial nematode *Mansonella perstans*. *Mol Biochem Parasitol* 160: 123-128.

Lee SF, White VL, Weeks AR, Hoffmann AA and Endersby NM (2012) High-throughput PCR assays to monitor *Wolbachia* infection in the dengue mosquito (*Aedes aegypti*) and *Drosophila simulans*. *Appl Environ Microbiol* 78(13): 4740-4743.

Malogolowkin C (1952) Sobre a genitália dos "Drosophilidae" (Diptera). III Grupo *willistoni* do gênero *Drosophila*. *Rev Bras Biol* 12: 79-96.

Mateos M, Castrezana SJ, Nankivell BJ, Estes AM, Markow TA and Moran NA (2006) Heritable endosymbionts of *Drosophila*. *Genetics* 174, 363-376.

Merçot H and Charlat S (2004) *Wolbachia* infections in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: polymorphism and levels of cytoplasmic incompatibility. *Genetica* 120: 51-59.

Miller WJ and Riegler M (2006) Evolutionary dynamics of *wAu*-like *Wolbachia* variants in

neotropical *Drosophila* spp. Appl Environ Microbiol 72: 826-835.

Miller WJ, Ehrman L and Schneider D (2010) Infectious speciation revisited: impact of symbiont-depletion on female fitness and mating behavior of *Drosophila paulistorum*. PLoS Pathogens 6: e1001214.

Müller MJ, Von Mühlen C, Valiati VH and Valente VLS (2012) *Wolbachia pipientis* is associated with different mitochondrial haplotypes in natural populations of *Drosophila willistoni*. J Invert Pathol 109: 152-155.

Nunes MDS, Nolte V and Schlötterer C (2008) Nonrandom *Wolbachia* infection status of *Drosophila melanogaster* strains with different mtDNA haplotypes. Mol Biol Evol 25: 2493-2498.

O'Neill SL and Karr TL (1990) Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. Nature 348:178-180.

O'Neill SL, Giordano R, Colbert AM, Karr TL and Robertson HM (1992) 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. Proc Natl Ac Sci USA 89: 2699 - 2702.

O'Neill SL, Hoffmann AA and Werren JH (1997) Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction. Oxford University Press, Oxford, 214 pp.

Panaram K and Marshall JL (2007) F supergroup *Wolbachia* in bush crickets: what do patterns of sequence variation reveal about this supergroup and horizontal transfer between nematodes and arthropods? Genetica 130: 53-60.

Patterson JT and Mainland GB (1944) Studies in the genetics of *Drosophila*. IV. Papers dealing with taxonomy, nutrition, cytology and interspecific hybridization in *Drosophila*. I. The drosophilidae of México. The Univ Texas Publ 4445: 9-101.

Peng Y, Nielsen JE, Cunningham JP and McGraw EA (2008) *Wolbachia* infection alters olfactory cued locomotion in *Drosophila*. Appl Environ Microbiol 74(13): 3943-3948.

Pérez-Salas S, Richmond RC, Pavlovsky O, Ehrman L and Dobzhansky T (1970) The interior semiespecies of *Drosophila paulistorum*. Evolution 24: 519-527.

Powell JR (1997) Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The *Drosophila* Model. Oxford University Press, Oxford, 576 pp.

Riegler M and O'Neill SL (2004) The genus *Wolbachia*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH and Stackebrandt E (eds.) The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community. Springer-Verlag, New York.

- Riegler M and O'Neill SL (2007) Evolutionary dynamics of insect symbiont associations. *Trends Ecol Evol* 22: 625-27.
- Riegler M, Sidhu M, Miller WJ and O'Neill SL (2005) Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* 15:1428-1433.
- Riegler M, Iturbe-Ormaetxe I, Woolfit M, Miller WJ and O'Neill SL (2012) Tandem repeat markers as novel diagnostic tools for high resolution fingerprinting of *Wolbachia*. *BMC Microbiol* 12: S12.
- Ritchie MG and Gleason JM (1995) Rapid evolution of courtship song pattern in *Drosophila willistoni* sibling species. *J Evol Biol* 8: 463-479.
- Robe LJ, Cordeiro J, Loreto EL and Valente VLS (2010) Taxonomic boundaries, phylogenetic relationships and biogeography of the *Drosophila willistoni* subgroup (Diptera: Drosophilidae). *Genetica* 138: 601-617.
- Rohde C, Garcia AC, Valiati VH and Valente VL (2006) Chromosomal evolution of sibling species of the *Drosophila willistoni* group. I. Chromosomal arm IIR (Muller's element B). *Genetica* 126: 77-88.
- Ros VID, Fleming VM, Feil EJ and Breeuwer AJ (2009) How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari, Tetranychidae). *Appl Environ Microbiol* 75:1036-1043.
- Rousset F, Vautrin D and Solignac M (1992) Molecular identification of *Wolbachia*, the agent of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* and variability in relation with host mitochondrial types. *Proc Biol Sci* 247:163 -1668.
- Rousset F, Bouchon D, Pintureau B, Juchault P and Solignac M (1992) *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc Biol Sci* 250: 91-98.
- Rowley SM, Raven RJ and McGraw EA (2004) *Wolbachia pipientis* in Australian spiders. *Curr Microbiol* 49: 208-214.
- Rozhok A, Bilousov O, Kolodochka L, Zabludovska S and Kozeretska I (2011) Horizontal transmission of intracellular endosymbiotic bacteria: a case between mites and fruit flies and its evolutionary implications. *Drosophila Inf Serv* 94: 74-79.
- Sene FM, Val FC, Vilela CR and Pereira MAQR (1980) Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* species within morphoclimatic domains of Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia* 33: 315-326.

Shoemaker DD, Katju V and Jaenike J (1999) *Wolbachia* and the evolution of reproductive isolation between *Drosophilla recens* and *Drosophila subquinaria*. *Evolution* 53: 1157-1164.

Shoemaker DD, Dyer KA, Ahrens M, McAbee K and Jaenike J (2004) Decreased diversity but increased substitution rate in host mtDNA as a consequence of *Wolbachia* endosymbiont infection. *Genetics* 168: 2049-2058.

Simoncini L, Casiraghi M, Bazzocchi C, Sacchi L, Bandi C and Genchi C (2001) Real-time PCR for quantification of the bacterial endosymbionts (*Wolbachia*) of filarial nematodes. *Parassitologia* 43: 173-178.

Sinkins SP (2004) *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. *Insect Bioch Mol Biol* 34: 723-729.

Spassky B (1957) Morphological differences between sibling species of *Drosophila*. *Genetics Drosophila* 5721: 48-61.

Spassky B, Richmond RC, Pérez-Salas S, Pavlovsky O, Mourão CA, Hunter AS, Hoenigsberg H, Dobzhansky T and Ayala FJ (1971) Geography of the sibling species related to *Drosophila willistoni*, and of the semispecies of the *Drosophila paulistorum* complex. *Evolution* 25: 129-143.

Spieth (1949) Sexual behavior and isolation in *Drosophila*. II. The interspecific mating behavior of species of the *willistoni* group. *Evolution* 3: 67-81.

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

Sturtevant, AH (1921) The North American species of *Drosophila*. Carnegie Inst Wash Publi 301, 150 pp.

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

Turelli M and Hoffmann AA (1991) Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila*. *Nature* 353: 440-442.

Valente VLS and Araújo AM (1986) Comments on breeding sites of *Drosophila willistoni* Sturtevant (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Entomol.* 30: 281-286.

Valiati VH and Valente VLS (1996) Observations on ecological parameters of urban populations of *Drosophila paulistorum* Dobzhansky & Pavan (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Bras. Entomol.* 40: 225-231.

Vandekerckhove TTM, Watteyne S, Willems A, Swings JG, Mertend J and Gillis M (1999) Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the cytoplasmic bacterium *Wolbachia* from the novel host *Folsomia candida* (Hexapoda, Collembola) and its implications for *Wolbachia* taxonomy. FEMS Microbiol Lett 180: 279-286.

Weeks AR, Turelli M, Harcombe WR, Reynolds KT and Hoffmann AA (2007) From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. PLoS Biol 5:114.

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

Werren JH and Bartos JD (2001) Recombination in *Wolbachia*. Curr Biol 11(6): 431-435.

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

Werren JH, Zhang W and Guo LR (1995a) Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. Proceedings of the Royal Society of London. Series B 261: 55-71.

Werren JH, Windsor D and Guo LR (1995b) Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. Proc Biol Sci 262: 197-204.

Winge H and Cordeiro AR (1963) Experimental hybrids between *Drosophila willistoni* Sturtevant and *Drosophila paulistorum* Dobzhansky and Pavan from Southern marginal populations. Heredity 18: 215-222.

Winge H (1965) Interspecific hybridisation between the six cryptic species of *Drosophila willistoni* group. Heredity 20: 9-19.

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