

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

**PRIMEIRO REGISTRO DE *WOLBACHIA* (PROTEOBACTERIA,
RICKETTSIALES) EM ISÓPODOS TERRESTRES NA AMÉRICA DO SUL:
PREVALÊNCIA, ASPECTOS FILOGENÉTICOS DE SUAS LINHAGENS E SEU
POSSÍVEL IMPACTO SOBRE A ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL
ESTIMADA ATRAVÉS DE UM LOCO MITOCONDRIAL EM DUAS ESPÉCIES
DO GÊNERO *BALLONISCUS* (CRUSTACEA: ONISCIDEA)**

Aluno: Mauricio Pereira Almerão

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

Orientador: Aldo Mellender de Araújo
Coorientadora: Paula Beatriz Araujo

PORTO ALEGRE, JULHO DE 2009

INSTITUIÇÕES E AGÊNCIAS DE FOMENTO

O presente projeto foi desenvolvido em diferentes laboratórios: Laboratório de Genética Ecológica, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Laboratório de *Drosophila* do mesmo departamento e *Laboratoire, Ecologie, Evolution, Symbiose* (LEES) UMR CNRS 6556, Universidade de Poitiers, França. O trabalho foi fomentado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). De mesma forma, a tese recebeu fomento do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, que custeou saídas à campo e, principalmente o retorno do doutorando à França por um período de três meses. Além destes, o trabalho recebeu apoio de verbas previstas no Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX, CNPq).

AGRADECIMENTOS

Posso dizer que aconteceu um pouco de tudo ao longo desse trabalho, momentos de mudança e de alguma dificuldade (de projeto e de país), mas vários momentos de convívio saudável, descontração e, acima de tudo bons resultados. Não posso falar da trajetória que percorri durante o desenvolvimento deste trabalho, sem inseri-lo dentro da minha carreira acadêmica, pois se trata de uma etapa final dentro de um ciclo e da minha vida pessoal. Evidentemente que são 30 anos de vida, sendo 10 deles dedicados a pesquisa e, eu precisaria de muitas páginas para agradecer tantas pessoas importantes ao longo desta trajetória. Por outro lado, vou citar algumas dessas pessoas importantes (e algumas fundamentais) ao longo da minha trajetória pessoal e profissional.

À minha família (Sônia, Francisco e Mariana) simplesmente por existir.

Faço um agradecimento especial à Prof Georgina Bond-Buckup que me recebeu em seu laboratório em março de 1999, me proporcionando os primeiros passos dentro pesquisa. Além disso, agradeço por ter sido muito mais que orientadora científica. Obrigado pelo carinho, pela atenção e pela sensibilidade em perceber que muitas vezes as pessoas passam por momentos difíceis e nunca vou esquecer da sua generosidade e amizade.

A todos os colegas e amigos do Departamento de Zoologia da UFRGS com quem convivo há muitos anos. Um agradecimento aos colegas e amigos do Laboratório de Carcinologia da UFRGS pelos anos de convivência, especialmente Carolina e Daiana.

De todos os colegas com quem convivi, um destes tornou-se o mais AMIGO de todos. Um agradecimento muito mais do que especial a Aline Ferreira Quadros pela amizade, carinho, ajuda e todos os momentos sempre agradáveis e descontraídos. Além disso, esse agradecimento deveria estar nas páginas nas quais faço menção às agências de

fomento, pois foi fonte inesgotável de “fomento” as minhas idéias, muitas vezes malucas. Muito obrigado pelo constante incentivo ao meu trabalho.

Falando em “fomento de idéias”, quero fazer um outro agradecimento especial à minha Coorientadora Paula Beatriz Araujo, que foi responsável direta pela possibilidade de boa parte deste trabalho ter sido realizada no exterior, através de um doutorado sanduíche. Agradeço também pelo incentivo constante, às críticas que são sempre construtivas e à amizade e atenção dispensadas ao longo de mais de 10 anos de convivência.

Ao meu orientador, Professor Aldo Mellender de Araújo agradeço, antes de qualquer coisa, pelo aceite em me receber como orientado de doutorado. Além disso, assim como a Prof Paula Beatriz Araujo, foi incentivador incansável do meu doutorado-sanduíche. Agradeço também pela total liberdade nas idéias e ações, pela amizade e respeito construídos nesses anos de convivência e por fazer de suas verbas pessoais de taxa de bancada (CNPq), fontes inesgotáveis de recursos financiadores. Não esqueçerei do seu gesto em financiar parte das minhas aulas de francês.

Ao Professor Nelson Jurandir Rosa Fagundes um agradecimento muito especial. Sem a sua competente ajuda com os programas de análises e as intermináveis discussões sobre os resultados, provavelmente esta tese não estaria sendo finalizada nesse momento.

Aos colegas do Departamento de Genética/UFRGS pela amizade. Aos secretários Elmo Cardoso e Ellen de Oliveira Mezzeck pela amizade e acima de tudo pelo serviço de competência que prestam a todos do departamento. Da mesma forma, agradeço à Prof. Maria Cátira Bortolini, coordenadora do PPGBM por ter aprovado verba utilizada para continuação do trabalho em Poitiers, França.

A todos os colegas do Laboratório de Genética Ecológica, especialmente Ernesto, Nicolás, Adriano e Lucas pela amizade, coleguismo e pelas saídas de campo inesquecíveis.

Faço um agradecimento mais demorado na próxima seção a todas as pessoas envolvidas durante meu doutorado sanduíche em Poitiers na França na seção seguinte.

A minha namorada Cristina Schiel Santiago (Kikita) pela compreensão nos momentos de ausência, carinho e atenção nesse tempo que estamos juntos e, acima de tudo por suportar alguém tão “mala” como eu.

REMERCIEMENTS

On peut penser qu'il est toujours difficile l'expérience (soit personnelle soit professionnelle) à l'étranger. Dans mon cas, j'ai passé un an à l'étranger, plus exactement à Poitiers en France au labo LEES (Laboratoire, Ecologie, Evolution et Symbiose) où j'ai fait une très importante partie de mon doctorat.

Avant tout, il faut faire un remerciement à quelqu'un de très important dans ce processus. À Raul Gomes de Almeida Filho, mon professeur de français qui pendant nos cours est devenu un ami cher. Il ne m'avait pas seulement appris les questions techniques de la langue française mais surtout il m'a montré un peu « l'ambiance française » et ses particularités. Au début, je ne savais rien du tout, pas seulement sur le laboratoire, mais aussi sur la vie en France, des français. Sincèrement, de loin j'avais une mauvaise impression de la France et des français. Malgré quelques problèmes qui, bien évidemment, existent en France je suis tombé sur un laboratoire SPÉCIALE et à cause de cela j'ai voulu faire une partie des mes remerciements en français et aussi il faut que je cite quelques personnes qui ont fait de mon séjour en France une expérience assez agréable et que je ne vais plus jamais les oublier.

Tout d'abord je tiens à exprimer mes remerciements à Yves Caubet, professeur du LEES et responsable à Poitiers pour mon séjour. Je n'oublierai jamais son accueil, l'aide avec «les grosses courses » au supermarché et surtout l'aide aussi au niveau de la bureaucratie française.

Je remercie tout autant Frédéric Grandjean, professeur et mon co-directeur de thèse en France, pour sa confiance et l'immense liberté d'action pendant le travail au LEES.

Je remercie aussi à Didier Bouchon, professeur et directeur du LEES, pour m'avoir très bien accueilli dans son laboratoire.

Un grand merci à tous les techniciens du LEES (Maryline Raimond, Catherine Debenest, Thierry Bauvais, Jérôme Lesobre, Tiffany Laverré et Christelle Mirebeau), spécialement à Carine Delaunay pour l'aide avec les dissections des animaux et surtout pour sa sympathie contagieuse. Un grand merci aussi à Daniel Guyonnet pour toute l'attention avec les séquençages.

Je ne manquerais pas de remercier toutes les personnes du LEES pour l'ambiance conviviale et très agréable et pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble. Il faut remercier des personnes inoubliables. Vincent Doublet, Maureen Labarussias, Samuel Pichon, Elodie Guignard, Sébastien Verne, Lenka Filipova, Frédéric Chévalier, Nicolás Cerveau, Juline Gaboreau, Alexandra Laffite, Clémence Duchâtel et Giuseppe Montesanto. Je n'ai pas de mots pour vous remercier. Vous êtes dans mon cœur pour tout le reste de ma vie.

Merci à tous les amis que j'ai connus pendant mon séjour, surtout mes amis-voisins dans les résidences Michel Foucault et Marie-Curie.

Enfin, je ne peux pas oublier mes amis brésiliens en France, Daniel Caon Alves, Fernando Oliveira de Andrade, Tatiana Marcondes, Cléber Lampert et surtout Ricardo Esteves et Lucilia Wuillaume pour leur amitié et pour avoir ouvert leur maison pour moi.

PREFÁCIO

O presente trabalho pretende contribuir para o conhecimento das relações simbióticas entre *Wolbachia* e seus hospedeiros, que talvez esteja entre as mais estudadas em âmbito internacional. Apesar de ser um tema ainda pouco explorado na América do Sul, no Brasil as pesquisas nesse tema vêm tornando-se mais numerosas e os resultados apontam para um futuro promissor. A partir desse trabalho, a interação entre *Wolbachia* e os isópodos terrestres, investigada desde a década de 70 pelo *LEES (Laboratoire Ecologie Evolution Symbiose)* em Poitiers na França, passou a ser investigada em espécies endêmicas da América do Sul como resultado de parceria entre a instituição citada entre os Departamentos de Genética e de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Em virtude do ineditismo dos dados e por se tratar de um documento de consulta para trabalhos futuros, a INTRODUÇÃO abrange não somente dados descritos na seção RESULTADOS, pois sua abrangência visa uma maior compreensão do tema por parte do leitor. O RESULTADOS estão apresentados em dois capítulos formatados em manuscritos a serem submetidos para publicação. No primeiro capítulo são descritos resultados referentes à diversidade de linhagens encontradas nas duas espécies investigadas (*B. glaber* e *B. sellowii*) e a prevalência das mesmas em populações estudadas ao longo da Planície Costeira do Rio Grande do Sul. No segundo capítulo os resultados referem-se à estruturação do mtDNA nessas mesmas populações e especula-se sobre o impacto de *Wolbachia* na estruturação observada do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI). Segue-se um capítulo DISCUSSÃO, no qual os dados gerados ao longo do trabalho são discutidos de uma forma mais ampla em relação ao que são discutidos nos manuscritos.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

OBJETIVOS

CAPÍTULO 2

Phylogeography of two species of *Balloniscus* (Crustacea, Oniscidea) in the Coastal Plain of Southern Brazil using mitochondrial COI gene

CAPÍTULO 3

First record of *Wolbachia* in South American terrestrial isopods: high diversity of *Wolbachia* strains in two species of *Balloniscus* (Crustacea: Oniscidea)

CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO GERAL

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXO I

Fotos *Balloniscus glaber*

ANEXO II

Fotos *Balloniscus glaber*

ANEXO III

Autorização para coleta de material biológico

ANEXO IV

Autorização para transporte de material biológico para o exterior

ANEXO V

Protocolos de rotina molecular detalhados

ANEXO VI

Alinhamento parcial do gene 16S rDNA (*Wolbachia*)

ANEXO VII

Alinhamento parcial do gene citocromo oxidase subunidade I (COI) (*Balloniscus*)

RESUMO

Embora muitos aspectos sobre a história de vida dos isópodos terrestres na América do Sul tenham sido investigados, alguns ainda são desconhecidos. Entre estes, está a relação simbiótica entre os isópodos terrestres e *Wolbachia pipientis*, uma espécie de alpha-proteobactéria, considerada um parasito intracelular obrigatório que infecta espécies de nematóides e praticamente todos os grupos de artrópodos, incluindo os isópodos terrestres (Oniscidea). Apesar de contestada, a filogenia mais aceita inclui as linhagens de *Wolbachia* em oito supergrupos (A-H), a partir da qual a transmissão horizontal (entre taxons) é corroborada. *Wolbachia* está presente em vários tecidos do hospedeiro, principalmente em tecidos reprodutivos e propaga-se por via materna para a prole, utilizando como estratégia de disseminação, a produção de fêmeas ao longo das gerações. Esse aumento na proporção de fêmeas surge como consequência dos fenótipos induzidos gerados pela interação *Wolbachia*-hospedeiro. A cotransmissão de *Wolbachia* e outros elementos presentes no citoplasma (p. ex. mitocôndrias) gera um desequilíbrio de ligação entre os mesmos. Este fenômeno juntamente com a taxa de transmissão vertical, competição entre linhagens e ancestralidade da invasão são fatores que podem contribuir para alterações na estruturação do mtDNA nas populações hospedeiras. Todas essas características fazem de *Wolbachia* um fator que pode estar envolvido no processo de especiação.

O presente trabalho descreve o primeiro registro de *Wolbachia* em espécies de isópodos terrestres endêmicas da América do Sul, mais especificamente em duas espécies do gênero *Balloniscus* (Crustacea, Oniscidea). No total, foram observadas 16 novas linhagens em populações distribuídas ao longo da Planície Costeira do Rio Grande do Sul. A partir de uma abordagem populacional, observou-se variação nas prevalências intra e interespecíficas. Em média, as prevalências foram mais altas em populações de *B. glaber* do que em relação a *B. sellowii*. Todas as linhagens encontradas situaram-se dentro do Supergrupo B, no qual situam-se também as demais linhagens presentes em isópodos terrestres. Entretanto, as topologias geradas sugerem rotas de transmissão horizontais alternativas para as linhagens de *Wolbachia* encontradas em ambas as espécies de *Balloniscus*.

A partir da idéia de impacto de *Wolbachia* sobre a estruturação do mtDNA, foi realizado um estudo genético populacional ao longo da Planície Costeira do Rio Grande do Sul baseado no gene COI. Apesar dos fracos indícios do impacto de *Wolbachia* sobre a estruturação do mtDNA, outros resultados foram alcançados. A história geológica de formação da Planície Costeira do Rio Grande do Sul parece ser diretamente associada aos agrupamentos (clados) observados. Os clados I, II e III incluíram populações de *B. sellowii*, enquanto que o clado IV foi composto exclusivamente por populações de *B. glaber*. As análises filogenéticas e a análise da variação genética entre as duas espécies sugeriram que existe um grande complexo composto pelas populações de *B. sellowii* e, possivelmente *B. glaber* seria uma espécie derivada de *B. sellowii*. Além disso, as análises sugerem ainda a população de São Lourenço do Sul (*B. sellowii*) pode se tratar ou de uma linhagem muito basal dentro do complexo *B. sellowii* ou de uma nova espécie. Essa população apresentou os níveis de diversidade mais elevados, sendo lançada a hipótese de que *Wolbachia* poderia estar envolvida no polimorfismo observado.

ABSTRACT

Although many aspects of the life history of South American terrestrial isopods have been investigated, some of them are still unknown. Among them is the symbiotic interaction between terrestrial isopods and *Wolbachia pipientis*, an alpha-proteobacteria, considered an obligate intracellular parasite which infects nematodes species and almost all arthropods groups, including terrestrial isopods (Oniscidea). Despite some disagreements, the most accepted *Wolbachia* phylogeny is comprised by eight supergroups (A-H), from which the horizontal transmission is corroborated. *Wolbachia*, is found in several tissues, mainly in reproductive ones; it is maternally disseminated to the progeny using as strategy, the production of females over the generations. This increase in female proportion arises as a consequence of induced phenotypes generated by the interaction between *Wolbachia* and its host. The cotransmission between *Wolbachia* and other cytoplasm elements (e.g mitochondria) creates linkage disequilibrium between them. This phenomenon together with the vertical transmission, competition between lineages and ancestry of the invasion are factors that may contribute to changes in the mtDNA structure over host populations. All these characteristics make *Wolbachia* a factor that may be involved in the process of speciation.

This study shows the first record of *Wolbachia* in endemic South American terrestrial isopods, specifically in two species of the genus *Balloniscus* (Crustacea, Oniscidea). Overall, 16 new strains were observed in populations distributed along the coastal plain of Rio Grande do Sul. Based on a population approach, we observed variation in intra and interspecific prevalences. On average, the prevalence was higher in *B. glaber* than in *B. sellowii* populations. All strains were grouped in supergroup B, in which all *Wolbachia* strains found in terrestrial isopods are situated. However, the topologies indicated alternative routes for horizontal transmission of *Wolbachia* found in both *Balloniscus* species. From the idea of *Wolbachia* impact on the mtDNA structuring, we conducted a genetic study population along the coastal plain of Rio Grande do Sul based on COI gene. Despite the weak evidence of the impact of *Wolbachia* on the mtDNA structuring, other results have been achieved. The geological history of formation of the Coastal plain of Rio Grande do Sul seems directly involved on the grouping (clades) observed. The clades I, II and III included populations of *B. sellowii*, while clade IV was

composed exclusively of populations of *B. glaber*. The phylogenetic and genetic variation analysis between the two species suggests that there is a large complex formed by the populations of *B. sellowii* and, possibly *B. glaber* may be a species derived from a *B. sellowii*. Furthermore, our analysis also suggests that the population of São Lourenço do Sul (*B. sellowii*) may be very basal lineage within the *B. sellowii* complex or a new species. This population showed the highest levels of diversity, and we hypothesized that *Wolbachia* could be involved in the observed polymorphism.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1) Simbiose e Evolução

O termo simbiose foi definido pelo micologista alemão Anton de Bary (1879) como a convivência de organismos não similares ou simplesmente organismos com nomes diferentes. Posteriormente, o termo simbiose foi utilizado com o significado de associações biotróficas mutualísticas (Margulis, 1991), permanecendo até os dias atuais. De acordo com Parecer e Ahmadjian (2000), são três as associações interespecíficas consideradas como interações simbióticas: Mutualismo, Parasitismo e Comensalismo. Os autores ainda ressaltam que: 1) os limites entre cada uma dessas interações não são claros e que podem frequentemente ocorrer transições entre essas interações; 2) Dentre as interações citadas, o parasitismo parece ser a mais comum e, do ponto de vista evolutivo, o comensalismo e o mutualismo parecem surgir a partir do parasitismo. Com o objetivo de padronizar termos confusos utilizados na descrição das interações simbióticas, Starr (1975) criou um sistema de classificação para elas, a partir do qual um simbiote poderia ser classificado de acordo com a localização no corpo do hospedeiro, persistência, especificidade, dependência e pelos produtos gerados pela interação (Parecer e Ahmadjian, 2000). Da mesma forma, Margulis (1991) na tentativa de elucidar idéias equivocadas a respeito das interações simbióticas, categorizou as interações simbióticas em relações espaciais, temporais, metabólicas e genéticas.

Independente das classificações utilizadas e dos vários termos empregados, as interações simbióticas são sem dúvida, fontes de inovações evolutivas. Todavia, houve muita relutância em admitir a importância dessas interações no contexto evolutivo, principalmente durante o século XX. Nesse período foram vários os autores que

defenderam a importância das interações simbióticas ao longo da evolução dos organismos e várias são as questões que explicam a desconsideração dada às interações simbióticas como fonte de inovação genética (Sapp, 1991). Atualmente, as interações simbióticas são consideradas centrais em debates sobre evolução com vários periódicos e revistas especializadas nessa temática.

Na natureza existem vários exemplos de interações simbióticas entre espécies dos mais variados táxons, sendo observadas associações entre vírus, protistas, bactérias, animais e plantas (Parecer e Ahmadjian, 2000). Dentre os simbiontes mais comumente observados em artrópodos estão vários grupos de protozoários e bactérias, principalmente microsporídeos e gêneros como *Cardinium*, *Spiroplasma*, *Arsenophonus*, *Rickettsia* e *Wolbachia*, todos considerados “manipuladores da reprodução” (Gherna *et al.*, 1991; Hurst *et al.*, 1999a; Hurst *et al.*, 1999b; Weeks *et al.*, 2001; Ironside *et al.*, 2003; Zchori-Fein e Perlman, 2004; Weeks e Stouthamer, 2004; Gotoh *et al.*, 2007). Dentre estes, *Wolbachia* pode ser considerado o gênero de endossimbiontes mais observado em diferentes hospedeiros distribuídos em diversas partes do planeta e, conseqüentemente as interações simbióticas entre *Wolbachia* e seus hospedeiros estão entre as mais estudadas (Riegler e O’Neill, 2006).

2) Um estudo de caso: *Wolbachia pipientis*

2.1) Histórico

Wolbachia pipientis é uma espécie de α -proteobactéria, considerada um parasito intracelular obrigatório situando-se filogeneticamente próxima aos gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* et *Neorickettsia* (O’Neill *et al.*, 1992). Ainda não há consenso entre os pesquisadores sobre o real *status* taxonômico de *Wolbachia pipientis*. Alguns acreditam ser

uma espécie formada por várias linhagens e outros acreditam que as diferenças entre estas são suficientes para serem descritas como espécies distintas (Lo *et al.*, 2007). Devido a esta questão, grande parte da literatura, refere-se a espécie *Wolbachia pipientis* somente como *Wolbachia*.

Wolbachia foi descoberta por Hertig and Wolbach (1924) em ovários de *Culex pipiens* (Diptera), sendo posteriormente descrita por Hertig em 1936 (Hertig, 1936). Apesar desta descoberta datar da década de 30, foi somente nas décadas de 70, 80 e 90 que os estudos sobre *Wolbachia* aumentaram significativamente; hoje existem vários grupos de pesquisa em praticamente todas as partes do mundo se dedicam a esta temática.

2.2) Localização no hospedeiro e transmissão vertical e horizontal

Até o presente momento, *Wolbachia* foi detectada somente em invertebrados, mais especificamente em espécies de nematóides e praticamente em todos os grupos de artrópodos (Riegler e O'Neill, 2006). *Wolbachia* é uma bactéria gram negativa de forma cocóide ou baciliforme com duas membranas celulares e que estão enclausuradas dentro de um vacúolo (Hertig, 1936). O trabalho de Fenollar *et al.* (2003) foi o pioneiro no cultivo de *Wolbachia* fora das células hospedeiras, fato que era tido como improvável (O'Neill *et al.*, 1997; Dobson *et al.*, 2002; Noda *et al.*, 2002).

Wolbachia é transmitida verticalmente para a prole através do citoplasma dos oócitos e está presente em tecidos não reprodutivos e, principalmente em tecidos reprodutivos, sendo estes infectados por via transovarial (Dobson *et al.*, 1999; Taylor e Hoerauf, 1999). Em relação aos machos, durante a espermatogênese frequentemente *Wolbachia* é perdida do citoplasma das células espermáticas (Clark *et al.*, 2002; Veneti *et al.*, 2003).

Existem várias formas de identificá-la nos tecidos dos hospedeiros e dentre estas podem ser citados métodos histoquímicos, aqueles que utilizam anticorpos mono e policlonais e outros que utilizam hibridização *in situ* (Hertig, 1936; Heddi *et al.*, 1999). Por outro lado, todas estas técnicas citadas são complementares à técnica de PCR a partir da qual são amplificados genes específicos de *Wolbachia* (ou parte destes) para a diagnose de infecção no hospedeiro (ver secção *Wolbachia*: aspectos filogenéticos).

Como citado anteriormente, *Wolbachia* é transmitida verticalmente para a prole, podendo essa transmissão ser perfeita (infecção da prole $\cong 100\%$) ou imperfeita (infecção da prole $< 100\%$). A eficiência de transmissão tem sido muito estudada principalmente em espécies de *Drosophila* tanto em populações naturais quanto em populações mantidas em laboratório. Nas primeiras, têm sido observadas taxas de transmissões imperfeitas para a prole, enquanto em populações mantidas em laboratório observam-se mais frequentemente transmissões perfeitas (Hoffman and Turelli, 1988; Hoffmann *et al.*, 1990; Rigaud e Juchault, 1992; Turelli e Hoffmann, 1995; Hofmann *et al.*, 1998). Essa variação na eficiência de transmissão também tem sido observada em outras espécies (Hong *et al.*, 2002; Jiggins *et al.*, 2002; Kittayapong *et al.*, 2002; Rasgon e Scott, 2003; Cordaux *et al.*, 2004) e são vários os fatores relacionados à mesma: condições de cultivo, ocorrência de “antibióticos naturais”, existência de um sistema limitador da transmissão vertical presente no hospedeiro, ancestralidade da invasão e competição com outros simbiontes (Rigaud e Juchault, 1992; Clancy e Hoffmann, 1998; Merçot e Poinot, 1998; Hong *et al.*, 2002; Duron *et al.*, 2008).

Além de transmitida verticalmente, *Wolbachia* pode ser transmitida horizontalmente (entre taxons) de forma artificial e natural (Braig *et al.*, 1994; Bouchon *et al.*, 1998; Cordaux *et al.*, 2001). A transmissão artificial ocorre normalmente através da

injeção de fluidos de indivíduos infectados em indivíduos não infectados da mesma espécie ou em espécies diferentes (Boyle *et al.*, 1993; Rigaud e Juchault, 1995; Poinso *et al.*, 1998; Sasaki e Ishikawa, 2000). Dessa forma, são realizadas simulações que avaliam o poder de penetrância de uma determinada linhagem em um novo hospedeiro (Riegler *et al.*, 2004). Dentre as possíveis rotas de transmissão natural a mais investigada é a interação parasitóide/parasita-hospedeiro através da qual linhagens de *Wolbachia* seriam transmitidas entre espécies distantes (Vavre *et al.*, 1999; Noda *et al.*, 2001). Por outro lado, outros trabalhos não encontraram evidências para sustentar esta rota de transmissão (West *et al.*, 1998). A interação presa/predador seria uma rota possível de transmissão natural (Johanowicz e Hoy, 1996), assim como a divisão de recursos alimentares (Huigens *et al.*, 2004). Apesar das inúmeras evidências, não existe ainda comprovação experimental da frequência e das formas de transmissão horizontal natural. Por outro lado, a principal evidência para a sua existência baseia-se no fato que as diversas filogenias já construídas para *Wolbachia* não são as mesmas dos hospedeiros, ou seja, hospedeiros filogeneticamente próximos podem portar linhagens filogeneticamente distantes da bactéria.

2.3) Aspectos filogenéticos

Atualmente, *Wolbachia* é a única espécie pertencente ao gênero *Wolbachia*, família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales, que se situa filogeneticamente próximo a outros três gêneros da mesma família (*Anaplasma*, *Ehrlichia* and *Neorickettsia*) (Dumler *et al.*, 2001). Filogenias construídas baseadas no gene 16S rDNA, definiram *Wolbachia* como um grupo natural (monofilético) (O'Neill *et al.*, 1992; Bandi *et al.*, 1998; Lo *et al.*, 2002, Lo *et al.*, 2007). Análises filogenéticas do mesmo gene (16S rDNA) e dos genes *ftsZ* (envolvido

no processo de divisão celular), *groE* (operon codificador de proteínas relacionadas ao estresse por calor), espaçador 2 (localizado entre os genes 23S e 5S rRNA) e *wsp* (codificador de uma proteína de superfície), dividiram o gênero em oito diferentes clados que, devido a literatura corrente, serão tratados como supergrupos (Masui *et al.*, 1997; van Meer *et al.*, 1999; Lo *et al.*, 2002; Lo *et al.*, 2007).

Dessa forma, *Wolbachia* consiste em uma espécie dividida em oito supergrupos, sendo estes baseados principalmente nas análises dos genes 16S rDNA e *ftsZ*. Em virtude da falta de resolução das filogenias de *Wolbachia* com ambos os genes, foram desenhados *primers* para o gene *wsp* que possui uma taxa de evolução molecular muito mais rápida do que aqueles utilizados até então (Braig *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998). As análises filogenéticas baseadas no gene *wsp* mostraram uma maior quantidade de caracteres informativos, proporcionando um maior poder de resolução comparado com as análises baseadas nos outros genes citados (Zhou *et al.*, 1998). Grande parte das linhagens que infectam artrópodos está situada em dois supergrupos estreitamente aparentados denominados A e B (Werren *et al.*, 1995b), situando-se próximos ao Supergrupo G que comporta linhagens presentes em espécies de Arachnida, mais especificamente aranhas (Rowley *et al.*, 2004). Por outro lado, alguns estudos sugerem que o Supergrupo G seja composto por linhagens recombinantes dos Supergrupos A e B (Baldo e Werren, 2007). Os Supergrupos E (colémbolos), F (isópteros e nematóides) e H (isópteros) também comportam linhagens presentes em artrópodos. Entretanto análises sugerem que as relações entre estes não seja tão estreita quanto aquelas sugeridas para os Supergrupos A e B (Vandekerckhove *et al.*, 1999; Czarnetzki e Tebbe, 2004; Casiraghi *et al.*, 2005; Bordenstein e Rosengaus, 2005). Apesar de também estarem presentes no Supergrupo F, a maior parte das linhagens presentes em nematóides são encontradas nos Supergrupos C e

D (Bandi *et al.*, 1998). Além disso, no nematóide *Dirofilaria repens* ocorre uma linhagem muito divergente das conhecidas para o grupo que provavelmente constituiria um novo supergrupo, o mesmo ocorrendo para uma linhagem encontrada em espécies de pulgas (Siphonaptera) (Gorham *et al.*, 2003; Casiraghi *et al.*, 2005).

Além de métodos de fluorescência citados para a detecção de *Wolbachia*, a amplificação de genes (ou parte destes) via PCR constitui-se o método mais utilizado. Dentre os genes mais utilizados estão 16S rDNA, *ftsZ* e *wsp* que, da mesma forma são utilizados na identificação de novas linhagens via sequenciamento. Apesar disso, tais genes possuem limitações na identificação de novas linhagens. O gene 16S rDNA foi o primeiro a ser testado para a detecção de *Wolbachia* e ainda é bastante utilizado para esta finalidade por ser considerado o mais eficiente na detecção de linhagens de todos os supergrupos existentes (O'Neill *et al.*, 1992; Werren *et al.*, 1995b; Bandi *et al.*, 1998; Vandekerckhove *et al.*, 1999; Bouchon *et al.*, 1998; Rowley *et al.*, 2004; Bordenstein e Rosengaus, 2005). Apesar dessa característica, a detecção de *Wolbachia* através deste gene seria prejudicada devido ao seu baixo polimorfismo, tornando difícil à detecção não somente de uma nova linhagem, mas também de co-infecções (Riegler e O'Neill, 2006). Da mesma forma, devido as suas características e da forma de evoluírem os genes *ftsZ* e *wsp* apresentam limitações nas suas utilizações para fins filogenéticos (Schulenburg *et al.*, 2000; Malloch e Fenton, 2005). Por exemplo, eventos de recombinação têm sido evidenciados, principalmente entre regiões do gene *wsp* (Werren e Bartos, 2001; Baldo *et al.*, 2005). Além destes, o operon *groE* tem sido proposto como um gene potencial na construção de filogenias, pois contém regiões conservadas e variáveis e parece ser pouco propenso a recombinações (Baldo *et al.*, 2006a). Ainda em relação as limitações dos genes citados, a

sensibilidade de tais genes pode estar diretamente relacionada a quantidade de DNA extraído, gerando falsos positivos e negativos nas reações de PCR (Hong *et al.*, 2002).

Tendo em vista essas limitações e na tentativa de padronizar a identificação de novas linhagens, adaptou-se a técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) (Baldo *et al.* 2006b), utilizada tradicionalmente em estudos com bactérias patogênicas recombinantes (Maiden *et al.*, 1998). A MLST desenvolvida para *Wolbachia* utiliza cinco genes conservados, (*ftsZ*, *gatB*, *coxA*, *hcpA* e *fbpA*) e que foram escolhidos segundo quatro critérios (presença na Ordem Rickettsiales, uma única cópia no genoma da linhagem *wMel*, ampla distribuição no genoma da linhagem *wMel* e evidência de forte seleção estabilizadora dentro do grupo *Wolbachia*) (<http://pubmlst.org/wolbachia/info/genes.shtml>). Esses genes foram testados inicialmente para linhagens dos supergrupos A e B e posteriormente para outras linhagens (Baldo *et al.*, 2006b; Baldo e Werren, 2007). Devido tanto às discrepâncias entre os resultados obtidos com genes isoladamente (p. ex, *wsp*) quanto as suas limitações em discriminar novas linhagens, vem sendo proposta a revisão de todos os supergrupos através da MLST (Baldo e Werren, 2007). Apesar da MLST estar proporcionando uma base padronizada de dados relativos às linhagens de *Wolbachia*, sobre a qual as filogenias poderão ser futuramente reconstruídas, a mesma pode ser limitada por eventos de seleção e recombinação dos genes propostos na mesma (Baldo *et al.*, 2006a).

2.4) Prevalência em populações hospedeiras

Vários são os termos empregados em parasitologia em relação à frequência dos parasitas e muitos destes termos são empregados de forma equivocada. Em virtude de *Wolbachia* constituir-se parasito/mutual envolvido na reprodução, segue-se a definição do

termo Prevalência utilizado neste trabalho, sugerido por Margulis *et al* (1982) e ampliado por Bush *et al* (1997).

Prevalência: número de hospedeiros infectados com um ou mais indivíduos de uma espécie parasita. Consiste em uma estatística descritiva para dados de presença/ausência do(s) parasito(s) em uma amostra de hospedeiros objetivando classificar os mesmos em infectados e não infectados. Possui como sinônimos os termos: percentagem de infecção, percentagem de infestação e extensão de infecção.

Estudos recentes estimam que *Wolbachia* infecta praticamente todos os grupos em Arthropoda (Werren *et al.*, 1995a) e algumas espécies em Nematoda (Bandi *et al.*, 1998; Taylor e Hoerauf, 1999). Dentre os artrópodos existem registros de infecção em Insecta com 17% a 75% de espécies infectadas (Jeyaprakash e Hoy, 2000; Plantard *et al.*, 1999; Wenseleers *et al.*, 1998; Werren *et al.*, 1995a; Werren e Windsor, 2000), em Crustacea, mais especificamente em Oniscidea, com 61% de espécies infectadas (Bouchon *et al.*, 2008) e em Chelicerata (Breeuwer e Jacobs, 1996; Gotoh *et al.*, 2003; Rowley *et al.*, 2004). Esta diversidade de hospedeiros infectados sugere que *Wolbachia* seja um parasito ubíquo com grande capacidade de adaptação a diferentes hospedeiros (Rigaud, 1999).

Apesar do grande esforço dos pesquisadores em levantar dados sobre a prevalência de *Wolbachia* nos diversos grupos, tais dados foram e/ou podem estar sendo sub ou superestimados, com alguns fatores contribuindo fortemente para tais desvios (Cook e Butcher, 1999; Li *et al.*, 2007; Hilgenboecker *et al.*, 2008). Subestimativas estão relacionadas à falta de amostragens populacionais (nem todas as populações estão infectadas) e à coexistência de indivíduos infectados e não infectados em uma mesma população. Por outro lado, superestimativas podem ocorrer pelas mesmas razões expostas anteriormente e também pela Transferência Lateral de Genes (TLG). A partir do

sequenciamento de determinadas linhagens de *Wolbachia* (Wu *et al.*, 2004; Foster *et al.*, 2005; Klasson *et al.*, 2008), este fenômeno vem sendo demonstrado experimentalmente. A TLG consiste na transferência de gene(s) ou parte deste(s) entre *Wolbachia* e seu hospedeiro (Fenn *et al.*, 2006; Blaxter, 2007; Hotopp *et al.*, 2007; Klasson *et al.*, 2009; Ros e Hurst, 2009; Woolfit *et al.*, 2009). Uma consequência direta deste processo é a detecção de *Wolbachia* via PCR mesmo se o indivíduo testado não estiver realmente infectado ou mesmo se tais genes não se expressem (pseudogenes). Na espécie *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera) constatou-se que nessas detecções, os genes *wsp* e *ftsZ* foram amplificados enquanto que, para os mesmos indivíduos, outros dois genes (*groE* e 16S rDNA) as detecções foram negativas. Esse resultado foi atribuído à TLG observada entre o genoma da bactéria e um dos braços do cromossomo X. Aproximadamente 30% do material genético da linhagem de *Wolbachia* que infecta *Callosobruchus chinensis* estaria inserida no genoma do mesmo (Kondo *et al.*, 2002; Nikoh *et al.*, 2008).

2.5) Efeitos no hospedeiro

Como visto anteriormente, *Wolbachia* é encontrada em íntima associação com tecidos do hospedeiro, sendo transmitida via materna para a prole. *Wolbachia* utiliza como estratégia de disseminação, a produção de fêmeas ao longo das gerações, distorcendo a razão sexual da prole em favor das mesmas. Esse aumento na proporção de fêmeas surge como consequência dos efeitos induzidos gerados pela interação *Wolbachia*-hospedeiro. A literatura corrente trata tais efeitos como FENÓTIPOS e daqui a diante será citado dessa forma. Até o momento, cinco fenótipos foram descritos e estes serão detalhados a seguir.

Incompatibilidade Citoplasmática (IC): observado em espécies de Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Arachnida e Isopoda (Hoffman e Turelli, 1997).

A IC foi o primeiro fenótipo identificado associado à presença de *Wolbachia*, em mosquitos do gênero *Culex*, na década de 70, a partir da não obtenção de progênie em algumas direções de certos cruzamentos intraespecíficos. Yen e Barr (1971) estabeleceram que IC estava associada à presença da bactéria nos tecidos reprodutivos de fêmeas do mosquito, estabelecendo a relação de causa e efeito através de experimentos de cura por antibióticos. A partir desse experimento e das investigações posteriores, o modelo *mod/resc* foi sugerido para explicar a IC. O modelo descreve modificação do espermatozóide durante a espermatogênese (*modification* ou “*mod function*”) pela presença de *Wolbachia*, ocasionando a morte de embriões a menos que uma linhagem relacionada esteja presente nos oócitos. Dessa forma, reestabelece-se assim a viabilidade dos cruzamentos (*rescue* ou “*resc function*”). O modelo classifica as linhagens indutoras de IC de acordo com suas capacidades *mod* e *resc*. Por exemplo, uma linhagem classificada como *mod+* *resc+* pode “restaurar” modificações ocasionadas pela mesma linhagem enquanto outra classificada como *mod-* *resc+* é incapaz de gerar modificações no espermatozóide, mas pode restaurar tais modificações geradas por linhagens relacionadas. Este modelo também é utilizado para explicar a IC bidirecional na qual indivíduos estão infectados com diferentes linhagens de *Wolbachia* ou ainda IC unidirecional na qual indivíduos estão infectados por quantidades variáveis de diferentes linhagens (Rigler e O’Neill, 2006)

Em relação aos mecanismos citológicos envolvidos na IC, *Wolbachia* promove modificações no prónucleo dos espermatozóides, impossibilitando o mesmo de completar a cariogamia durante a fertilização dos oócitos, ocasionando a letalidade dos embriões em espécies diplóides ou haplodiplóides e alterando a produção de machos em espécies diplóides (Breeuwer e Werren, 1993; Vavre *et al.*, 2000). Apesar das bases moleculares e

bioquímicas da IC não serem bem conhecidas, análises citológicas sugerem que *Wolbachia* atuaria sobre proteínas que regulam o ciclo celular, retardando a entrada do prónucleo masculino na primeira divisão mitótica por inibição direta ou indireta (Tram e Sulivam, 2002; Tram *et al.*, 2003).

Feminização: observado em espécies de Isopoda, Lepidoptera e Hemiptera (Bouchon *et al.*, 1998; Hiroki *et al.*, 2002; Hiroki *et al.*, 2004; Negri *et al.*, 2006). Assim como a IC, a feminização é um efeito induzido que culmina na transformação de machos genéticos em fêmeas funcionais. Como consequência direta, há um significativo aumento de fêmeas na descendência (>50%). Entre os Isopoda estudados, *Armadillium vulgare* é a espécie sobre a qual mais aspectos envolvidos na feminização são conhecidos. Assim como em espécies de Lepidoptera, em Isopoda as fêmeas são heterogaméticas (ZW) e os machos monogaméticos (ZZ). Em *A. vulgare*, além de *Wolbachia* foi identificado o elemento *f* que sugere-se ser uma parte do genoma da bactéria inserido de forma instável no genoma do hospedeiro (Legrand e Juchault, 1984; Juchault e Mocquart, 1993). Juchault e Mocquart (1993) sugeriram que tal elemento estaria integrado de maneira estável ao cromossomo Z, transformando este em um cromossomo W, sendo esta a principal via de surgimento de neofêmeas. Além disso, na mesma espécie foi identificado por cruzamento um gene autossômico chamado M, que atuaria sobre o cromossomo W, transformando fêmeas em machos. O gene M seria um gene de resitência que se comporta diferentemente na presença de *Wolbachia* e do elemento *f*, sendo o principal responsável pela geração de indivíduos interssexuados (Juchault e Legrand, 1976; Rigaud e Juchault, 1993). A geração de interssexuados também poderia estar relacionada à existência de um vírus masculinizante capaz de modificar caracteres sexuais secundários (Juchault *et al.*, 1991).

Partenogênese: Em espécies haplodiplóides, principalmente em Hymenoptera, Arachnida e Thysanoptera, machos (haplóides) desenvolvem-se a partir de ovos não fecundados (partenogênese arrenótoca ou arrenotoquia) e as fêmeas (diplóides) a partir de ovos fecundados (partenogênese telítoca, ou telitoquia). *Wolbachia* induz a partenogênese telítoca ou telitoquia em ovos infectados através de interferências durante a segregação dos cromossomos. Dois núcleos haplóides fusionam-se no final da primeira divisão mitótica ou durante a interfase antes da segunda divisão (Gottlieb *et al.*, 2002) e, dessa forma embriões desenvolvem-se em fêmeas diplóides (Stouthamer e Kazmer, 1994). As fêmeas infectadas são assim produzidas de maneira assexuada e suas descendências contêm duas vezes mais filhas, quando comparadas com aquelas de fêmeas não-infectadas (Stouthamer, 1997; Vandekerckhove *et al.*, 1999).

Morte de machos: Efeito observado em espécies de Coleoptera, Diptera e Lepidoptera (Fialho e Stevens, 2000; Hurst e Jiggins, 2000; Majerus *et al.*, 2000). *Wolbachia* causa a morte de machos no início do desenvolvimento embrionário, ocasionando um forte desvio da proporção sexual das proles para as fêmeas. A morte dos machos aumentaria o *fitness* das fêmeas, pois estas poderiam se alimentar dos machos mortos, reduzindo a competição entre os descendentes ou ainda diminuindo o risco de cruzamentos entre aparentados (Zeh *et al.*, 2005).

Apesar de muitas vezes serem mais frequentes em determinados taxa, tais efeitos induzidos ou fenótipos não são taxon/específicos e alguns trabalhos vem demonstrando que em uma escala evolutiva praticamente instantânea, *Wolbachia* pode induzir diferentes fenótipos em hospedeiros filogeneticamente muito próximos (Jaenike, 2007). Nesse estudo o autor, em experimentos de introgressão, infectou *Drosophila subquinaria* (espécie naturalmente não infectada) a partir de *D. recens* (espécie infectada com uma linhagem

causadora de IC). O autor constatou a ausência de efeito induzido em algumas populações, mas o fenótipo Morte de Machos em outras. Além disso, cruzamentos entre indivíduos de populações das duas espécies evidenciaram um sistema de resistência a este efeito, sendo este dominante, autossômico, multigênico e dependente do genótipo do zigoto e não dos genótipos parentais. Os resultados sugeriram que os fenótipos induzidos por *Wolbachia* são imprevisíveis em um novo hospedeiro mesmo que este seja filogeneticamente muito próximo a outra espécie na qual o efeito é conhecido.

Impacto sobre o *fitness*: Baseado no fato de que a invasão e manutenção de um simbionte verticalmente transmitido é amplamente dependente do sucesso reprodutivo do hospedeiro, criou-se uma idéia clássica de que tais simbiontes seriam selecionados para aumentar o *fitness* do hospedeiro, uma relação de simbiose mutualística (Fine, 1975; Yamamura, 1993). Este tipo de associação é observada entre *Wolbachia* e hospedeiros nematóides (Bandi *et al.*, 2001). Uma exceção à idéia clássica sobre simbiose mutualística é a do parasitismo reprodutivo (Werren e O'Neill, 1997), a partir do qual um simbionte verticalmente transmitido pode facilmente espalhar-se dentro de uma população mesmo se a infecção acarretar algum custo para o *fitness* do hospedeiro. Esse tipo de associação normalmente observada entre *Wolbachia* e hospedeiros artrópodos e efeitos sobre o *fitness* tem sido descritos para várias espécies de Diptera, Coleoptera e Hymenoptera (Hoffmann e Turelli, 1988; Wade e Chang, 1995; Hariri *et al.*, 1998; Bordestein e Werren, 2000; Dedeine *et al.*, 2001; Tagami *et al.*, 2001; Dedeine *et al.*, 2004, 2005) Estes podem ser medidos em fêmeas, machos ou ambos, os efeitos podem ser negativos, positivos ou inexistentes, ou ainda efeito temporário (limitado a um pequeno número de gerações seguidos da perda da infecção), permanente ou de duração indeterminada (Bordestein e Werren, 2000). Apesar dessa idéia de relações mutuais *Wolbachia*-hospedeiros

nematódeos e relações parasitárias entre *Wolbachia*-hospedeiros artrópodos, muitas dessas relações não são estáticas e há frequentemente transições de um tipo para o outro (Paracer e Ahmadjian, 2000). Weeks *et al.* (2007) observaram que modificação nessas relações entre *Wolbachia* e populações de *Drosophila simulans*. Globalmente, a presença de *Wolbachia* diminuía o *fitness* em fêmeas infectadas e estas, ao longo de duas décadas de análise, tornaram-se mais fecundas.

2.6) Impacto sobre a genética das populações hospedeiras

Como visto anteriormente, *Wolbachia* está presente no citoplasma de células hospedeiras e manipula sua reprodução, favorecendo fêmeas infectadas. A partir desse favorecimento, não somente *Wolbachia*, mas outros elementos presentes no citoplasma, como por exemplo as mitocôndrias, são cotransmitidos através do efeito “carona”, gerando um desequilíbrio de ligação (processo equivalente a quebra de ligação entre genes nucleares recombinantes). Dessa forma, *Wolbachia* encontra-se em desequilíbrio de ligação com as mitocôndrias e conseqüentemente com o mtDNA e este processo, juntamente com fatores como competição entre linhagens, taxa de transmissão vertical e ancestralidade da invasão por *Wolbachia* em uma determinada população, são fatores que podem contribuir para alterações da diversidade mitocondrial (mudança na frequência de haplótipos, na repartição de mutações entre os haplótipos, etc) (Hurst e Jiggins, 2005)

Essas alterações da diversidade mitocondrial referem-se ao aumento ou diminuição do polimorfismo mitocondrial, sendo este fenômeno diretamente relacionado a fatores já elencados. De forma geral, em um cenário envolvendo somente uma linhagem invasora em uma população livre de *Wolbachia*, à medida que a sua prevalência aumenta em uma dada população, pode ocorrer uma redução do polimorfismo mitocondrial, modificando a

frequência de mitotipos. Esse fenômeno ocorreria caso um mitotipo mais frequente estivesse associado a indivíduos infectados e outros mitotipos, mais raros não estivessem associados à *Wolbachia*. Essa redução do polimorfismo mitocondrial pode ser ainda maior, se uma nova linhagem de *Wolbachia* mais competitiva aparecer (por mutação ou transferência horizontal) e invadir sucessivamente a população hospedeira (Maynard-Smith e Haigh, 1974; Tajima, 1989). Alguns estudos vêm mostrando esta associação entre *Wolbachia* e um polimorfismo reduzido (Ballard *et al.*, 1996; Johnstone e Hurst, 1996; Dean *et al.*, 2003).

Em uma situação mais complexa, pode-se imaginar múltiplas infecções (por diferentes linhagens de *Wolbachia*), esperando-se uma dinâmica similar aquela observada no caso de infecções simples. Por outro lado, esta dinâmica pode ser alterada, caso diferentes linhagens estejam associadas a diferentes haplótipos. De uma forma geral, ocorrerá uma diminuição da diversidade mitocondrial em consequência de um balanço seletivo em um dado mitotipo associado a uma das linhagens. Por outro lado, este pode ser mantido caso as diferentes linhagens de *Wolbachia* possuam diferentes prevalências na população (Jiggins, 2003; Reuter e Keller, 2003; Hiroki *et al.*, 2004).

Ainda em relação a múltiplas infecções, linhagens de *Wolbachia* podem competir em uma população hospedeira e esta pode alterar a diversidade mitocondrial. A presença de uma linhagem residente (associada a um dado haplótipo) pode impedir (por competição) a propagação de uma linhagem invasora (associada a outro haplótipo) e, dessa forma limitar o fluxo gênico entre as populações (James e Ballard, 2000; Baudry *et al.*, 2003; Jiggins, 2003).

Além do número de linhagens de *Wolbachia*, outros dois fatores contribuem para alterações da diversidade mitocondrial: a ancestralidade da infecção por *Wolbachia* em

uma população e a taxa de transmissão da mesma para a prole (transmissão vertical). Quanto mais antiga for a infecção e mais baixa for a taxa de transmissão vertical, menos considerável será a alteração do polimorfismo dos indivíduos infectados. Nas borboletas *Acraea encedon* e *A. encedena*, por exemplo, há diferenças na ancestralidade de invasão das populações e na taxa de transmissão. A primeira apresenta uma infecção por *Wolbachia* mais ancestral e uma menor taxa de transmissão, fatores estes relacionados à falta de polimorfismo mitocondrial, que, por outro lado foi reduzido na segunda espécie (Jiggins, 2003). Ainda em relação à ancestralidade da infecção, quanto mais ancestral for a infecção maior será a probabilidade de aumentarem mutações neutras ocorrentes no mtDNA. Dessa forma, o polimorfismo mitocondrial em uma população pode aproximar-se a situação esperada em uma hipótese de neutralidade (Keller *et al.*, 2004; Marshall, 2004; Hurst e Jiggins, 2005).

Em relação à transmissão vertical, quando esta é imperfeita, somente novas mutações ocorrentes no mtDNA serão transmitidas e fixadas em uma dada população. Dessa forma, o tamanho efetivo da “população” de mtDNA será restrito ao das fêmeas infectadas (Johnstone e Hurst, 1996). Este fenômeno será mais pronunciado em linhagens pouco prevalentes, como linhagens presentes em espécies de *Drosophila* (Dyer e Jaenike, 2004).

Além de influenciar o polimorfismo mitocondrial de indivíduos infectados, *Wolbachia* também pode influenciar o polimorfismo mitocondrial de indivíduos não infectados, visto que a sua transmissão nem sempre é perfeita para a geração seguinte. Dessa forma há uma constante produção de indivíduos não infectados que possuem o mitotipo associado à infecção. Se tais indivíduos forem fêmeas seu haplótipo associado poderá manter-se no *pool* de indivíduos não infectados e, devido à continua produção

desses indivíduos por fêmeas infectadas, a frequência do haplótipo inicialmente associado à *Wolbachia* aumentará regularmente em frequência no *pool* de indivíduos não infectados. Tal processo poderá gerar uma forte redução na frequência dos haplótipos originais no *pool* de indivíduos não infectados, alterando assim a diversidade haplotípica (Turelli *et al.*, 1992; Jonhstone e Hurst, 1996)

Da mesma forma, uma linhagem *Wolbachia* que infecta uma determinada espécie, devido ao fenômeno de transmissão horizontal, pode alterar a diversidade mitocondrial de uma outra espécie (Rousset e Solgnac, 1995; Ballard, 2000; Lachaise *et al.*, 2000; Jiggins, 2003; Narita *et al.*, 2006). A consequência principal desse fenômeno é uma forte redução da diversidade mitocondrial. Por outro lado, a infecção por *Wolbachia* pode aumentar a divergência entre mtDNA de duas espécies diferentes (Shoemaker *et al.*, 2004). Além de consequências sobre a diversidade do mtDNA, a presença de *Wolbachia* pode impactar genes nucleares, cujos efeitos ainda são pouco conhecidos (Telschow, 2006; Engelstadter e Hurst, 2007). Embora esses estudos sejam preliminares, a utilização de marcadores moleculares nucleares pode auxiliar na detecção do impacto de *Wolbachia* sobre o mtDNA (Verne *et al.*, em preparação).

2.7) Especiação

Apesar de não existir consenso em considerar *Wolbachia* o principal agente envolvido no processo de especiação, inúmeros trabalhos evidenciam que a bactéria é um fator importante neste processo (Wade 2001; Weeks *et al.*, 2002; Charlat *et al.*, 2003). *Wolbachia* é capaz de modificar as capacidades reprodutivas dos machos e das fêmeas sem que necessariamente tenha ocorrido uma longa coevolução com o hospedeiro (West *et al.*, 1998). Basicamente, *Wolbachia* atua como agente especiador através de três vias:

Indução de Partenogênese, IC unidirecional e IC bidirecional (Rokas, 2000). Na primeira via, partindo-se do pressuposto da fixação de linhagens indutoras de Partenogênese Telítoca e de uma longa persistência na população, “espécies assexuadas” seriam originadas. A partir dos pressupostos citados, seria esperado que tais “espécies assexuadas” estivessem sujeitas a um processo irreversível à condição sexual, devido ao acúmulo de mutações deletérias em genes envolvidos na reprodução sexual (Werren, 1997). Estas evidências diretas e indiretas da ocorrência deste processo em algumas espécies (Zchori-Fein *et al.*, 1992; 1995; Pijls *et al.*, 1996) tem sido observadas. Através da segunda via, *Wolbachia* atuaria como uma das possíveis barreiras reprodutivas entre duas espécies, reforçando o processo de especiação (Shoemaker *et al.*, 1999) e, através da terceira via, *Wolbachia* seria capaz de limitar fluxo gênico em populações infectadas por diferentes linhagens que induzem IC bidirecional e também de promover o surgimento de mecanismos de isolamento reprodutivo através da redução do valor seletivo de cruzamentos entre populações (West *et al.* 1998; Shoemaker *et al.*, 1999; Bordenstein *et al.*, 2001; Telschow, 2005). Todavia é difícil de evidenciar se o isolamento reprodutivo entre duas espécies próximas, surge antes ou depois da infecção por diferentes linhagens de *Wolbachia*. Bordenstein *et al* (2001) evidenciaram que *Wolbachia* pode induzir um isolamento reprodutivo entre duas espécies de *Nasonia* mesmo antes do surgimento de mecanismos de isolamento reprodutivo como, esterilidade e não viabilidade dos híbridos. Apesar dessas evidências, a função de *Wolbachia* como agente envolvido na especiação ainda trata-se de uma questão muito controversa.

2.8) Estudos em isópodos terrestres

Os isópodos terrestres, conhecidos como tatuzinhos de jardim são crustáceos pertencentes à Superordem Peracarida, Ordem Isopoda e Subordem Oniscidea. Atualmente são conhecidas cerca de 3700 espécies, ocorrentes em todos os continentes (Schmalfuss, 2003). Evoluíram a partir de ancestrais marinhos e, apesar de limitações na habilidade de conservar água, foram capazes de habitar desde a zona litoral até campos, florestas, cavernas e desertos, demonstrando um enorme potencial adaptativo (Warburg, 1987). Os isópodos formam um grupo representativo da fauna de solo, exercendo grande influência na dinâmica da mesma. Além de participarem da formação do solo são importantes na reciclagem de nutrientes, bem como constituem fonte alimentar para uma variedade de organismos. Alimentam-se normalmente de plantas mortas, embora possam consumir também restos de animais mortos. Entre seus predadores destacam-se as aves, alguns mamíferos, anfíbios, algumas espécies de aranhas, insetos e miriápodos (Sutton, 1980). Os isópodos terrestres têm uma grande importância na ciclagem de nutrientes, devido a sua participação nas cadeias alimentares como detritívoros. Desta forma, ao consumir as folhas em decomposição, eles as retornam ao ambiente, através de suas fezes, de forma particulada, o que permite a ação mais rápida dos decompositores, devolvendo ao solo os nutrientes importantes para a produção primária. Estima-se que algumas de suas espécies, mais especificamente *Atlantoscia floridana* e *Balloniscus glaber* são capazes de processar 860 Kg de folhas por hectare/ano (Quadros e Araujo, 2008).

Em isópodos terrestres, *Wolbachia* foi observada pela primeira vez por Martin *et al* (1973) em *Armadillidium vulgare* e, posteriormente confirmada pelos trabalhos de Rousset *et al.* (1992) e Bouchon *et al.* (1998). A partir desta descoberta, seguem-se inúmeros trabalhos realizados no LEES (*Laboratoire Ecologie Evolution Symbiose*), situado em

Poitiers, França, utilizando *A. vulgare* e outras espécies como modelo de estudos sobre a sua interação com *Wolbachia*.

As análises filogenéticas realizadas com base nas seqüências dos genes 16S rDNA, *wsp*, *groE* e *ftsZ*, indicaram que as linhagens que infectam isópodos terrestres possuem uma origem polifilética dentro do Supergrupo B. Apesar disso, grande parte das seqüências de *Wolbachia* que infectam isópodos terrestres dentro de um subclado denominado Oniclade (Cordaux *et al.*, 2001; Bouchon *et al.*, 2008). As filogenias sugerem a ocorrência de transmissão horizontal não somente entre espécies de isópodos terrestres, mas também entre algumas destas e outros taxons (Cordaux *et al.*, 2001). Apesar de alguns testes realizados para presença de *Wolbachia* em espécies endêmicas da América do Sul (Caubet Y, comunicação pessoal), os resultados foram todos negativos. Em 2007, algumas populações do gênero *Balloniscus* Budde-Lund, 1908 (Isopoda, Oniscidea, Balloniscidae) foram investigadas e em vários indivíduos a presença da bactéria foi observada.

O gênero *Balloniscus* Budde-Lund, 1908, está representado por 6 espécies, com duas espécies endêmicas dos Estados Unidos. *B. nigricans* (Budde-Lund, 1885), *B. brevicornis* (Budde-Lund, 1885) e outras 4 espécies que ocorrem na América do Sul: *B. paraguayanus* (van Name, 1936), *B. maculatus* (Budde-Lund, 1885), *B. sellowii* (Brandt, 1833) e *B. glaber* Araújo e Zardo, 1995 (Schmalfuss, 2003). É possível que as espécies registradas para os EUA pertençam a outros gêneros.

No Rio Grande do Sul, são encontradas duas espécies: *B. sellowii* (Prancha 1 - Anexo I) e *B. glaber* (Prancha 2 - Anexo I). Segundo Lemos de Castro (1976) a área de distribuição de *B. sellowii* se situa entre os paralelos 20° e 40° sul, distribuindo-se desde o sudeste brasileiro até o sul da América do Sul. Por outro lado, *B. glaber* apresenta uma distribuição muito mais restrita, sendo encontrada quase que exclusivamente na Planície

Costeira do Rio Grande do Sul (Araújo, 1992). Em suas coletas, observou que as duas espécies ocupam ambientes ecologicamente diferentes, sendo *B. sellowii* geralmente encontrado em ambientes com influência antrópica, como terrenos baldios, pátios de residências, monoculturas, etc, enquanto que *B. glaber* é encontrado quase que exclusivamente em ambientes mais conservados comparados com os primeiros, sendo abundantes em matas nativas.

Como visto anteriormente, a presença de *Wolbachia* pode alterar o polimorfismo de genes nucleares e, principalmente o polimorfismo de genes mitocondriais. Estudos genético populacionais com isópodos terrestres estão tornando-se mais frequentes, principalmente aqueles utilizando genes mitocondriais (Charfi-Cheikrouha, 2003; Klossa-Kilia *et al.*, 2006; Parmekelis *et al.*, 2008; Poulakakis e Sfenthourakis, 2008). Em geral, tais estudos concluem que as populações de isópodos terrestres estão relativamente bem estruturadas (pouco fluxo gênico) e dessa forma, o *status* taxonômico de muitas destas deve ser revisado. Apesar dessas conclusões, grande parte dos estudos que utilizam marcadores mitocondriais, não citam a investigação sobre a presença/ausência de *Wolbachia* nas populações e são raros os estudos que investigam um possível efeito sobre a diversidade mitocondrial. Marcadé *et al.* (1999) e Michel-Salzat e Bouchon (2001) observaram a presença de dois grupos de haplótipos mitocondriais (PpA e PpB) em populações de *Porcellionides pruinosus* relacionados a três linhagens distintas de *Wolbachia* (*wPruI*, *wPruII* e *wPruIII*). Nos haplótipos do grupo PpA foram observadas infecções pelas três linhagens enquanto aqueles do grupo PpB somente por *wPruI*. Os autores atribuíram a total falta de polimorfismo nas populações francesas de *P. pruinosus* à presença de uma das linhagens (*wPruIII*). Da mesma forma, Verne *et al* (em preparação) analisando genes mitocondriais de *Armadillidium vulgare* observaram, baixos níveis de

diversidade em relação a outros estudos realizados com a mesma espécie (Grandjean *et al.*, 1993; Rigaud *et al.*, 1999). Em populações de *A. vulgare* foram observadas as três linhagens de *Wolbachia* descritas para a espécie (*wVulC*, *wVulM* e *wVulP*) associadas a oito haplótipos mitocondriais. Os autores observaram desequilíbrio de ligação entre infecção por *Wolbachia* e mtDNA, com associação de alguns haplótipos a algumas linhagens, sugerindo um efeito da infecção sobre o polimorfismo mitocondrial. Além disso, a análise da estruturação de tais haplótipos mostrou-se incongruente com os resultados obtidos a partir de genes nucleares (microssatélites), sugerindo que *Wolbachia* estaria envolvida nesse processo.

Os estudos sobre *Wolbachia* vêm ganhando atenção da comunidade científica na América do Sul, especialmente no Brasil (Ciociola Jr *et al.*, 2001; Selivon *et al.*, 2002; Heukelbach *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2005; Cõnsoli e Kitajima, 2006; Souza *et al.*, 2009). Além dos trabalhos citados, outros trazem informações sobre espécies infectadas por *Wolbachia*, ocorrentes no Brasil (Shoemaker *et al.*, 2000; Ono *et al.*, 2001; Vega *et al.*, 2002; Dittmar e Whiting, 2004; Reuter *et al.*, 2005; Lo e Evans, 2007). Apesar dessas descobertas e avanços, as investigações acerca do tema ainda são escassas, tendo em vista a diversidade faunística observada na América do Sul e particularmente no Brasil. A partir dessa diversidade, imagina-se que o número de espécies infectadas (principalmente artrópodos) por *Wolbachia* seja muito alto. Em relação aos isópodos terrestres existem aproximadamente 3700 espécies descritas de em todo o mundo e destas aproximadamente 130 ocorrem no Brasil (endêmicas e introduzidas) (Schmalfuss, 2003). Dessa forma, o objetivo mais amplo do presente trabalho foi evidenciar a presença de bactérias do gênero *Wolbachia* em espécies de isópodos terrestres endêmicos na América do Sul,

especialmente em duas espécies do gênero *Balloniscus*. Uma vez constatada a presença da bactéria traçaram-se os seguintes objetivos específicos:

1) Através da amplificação do gene 16S rDNA, analisar a presença/ausência de *Wolbachia* em diferentes populações de *Balloniscus glaber* e *B. sellowii* ao longo da Planície Costeira do Rio Grande do Sul;

2) Através de análises filogenéticas, analisar a diversidade de linhagens encontradas e comparar as relações de parentesco de tais linhagens entre si e com outras encontradas em diferentes hospedeiros.

3) Através da amplificação do gene mitocondrial citocromo-oxidase subunidade I (COI), analisar não somente as relações de parentesco intra e interespecífica entre duas espécies do gênero *Balloniscus* ao longo da Planície Costeira do Rio Grande do Sul, mas também um possível impacto de *Wolbachia* na diversidade mitocondrial observada.

Almerao MP, Fagundes NJR, Araujo PB, Delaunay C, C Verne S, Grandjean F, Bouchon D and Araujo AM Phylogeography of two species of *Balloniscus* (Crustacea, Oniscidea) in the Coastal Plain of Southern Brazil using mitochondrial COI gene
Biological Journal of Linnean Society (a ser submetido)

CAPÍTULO 2

Phylogeography of two species of *Balloniscus* (Crustacea, Oniscidea) in the Coastal Plain of Southern Brazil using mitochondrial COI gene

ALMERAO, MP¹, FAGUNDES, NJR¹, ARAUJO, PB.², DELAUNAY C³, VERNE, S.^{3,4}, GRANDJEAN, F.³, BOUCHON, D³ AND ARAUJO, AM¹.

1- Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, IB, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, C. Postal 15053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

2- Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Departamento de Zoologia, IB, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

3-Laboratoire Ecologie, Evolution, Symbiose, Université de Poitiers, UMR CNRS 6556, Poitiers, France

4- Department of Forest Sciences, University of British Columbia, #3225 - 2424 Main Mall, Vancouver BC V6T-1Z4, Canada

Abstract

We infer phylogenetic relationships two species of the genus *Balloniscus* distributed in the Coastal Plain of Southern Brazil, comparing partial mitochondrial DNA sequences of cytochrome oxidase subunit I (COI). Maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) analyses produced topologically identical trees that revealed complex phylogenetic relationships. Four clades were evidenced (three clades of *B. sellowii* and one clade of *B. glaber* populations). The geological history of formation of the Coastal plain of Rio Grande do Sul seems directly involved on the grouping (clades) observed. The phylogenetic and genetic variation analysis between the two species suggests that there is a large complex formed by the populations of *B. sellowii* and, possibly *B. glaber* may be a species derived from a *B. sellowii*. Furthermore, our analysis also suggests that the population of São Lourenço do Sul (*B. sellowii*) may be very basal lineage within the *B. sellowii* complex or a new species. This population showed the highest levels of diversity, and we hypothesized that *Wolbachia* could be involved in the observed polymorphism.

Introduction

Classically, phylogenetic relationships among terrestrial isopods (Crustacea, Isopoda, Oniscidea) has been investigated based on anatomical/morphological characters

(Schmalfuss, 1989; Wägele, 1989; Leistkow, 2001; Schmidt, 2002). In the last decade the phylogenetic relationships among congeneric species (or populations of nominal species) are being reassessed based on molecular data, especially using (mt)DNA genes (Marcadé *et al.*, 1999; Michel-Salzat & Bouchon, 2000; Rivera *et al.*, 2002; Wetzler, 2002; Charfi-Cheikrouha, 2003; Mattern, 2003; Taiti *et al.*, 2003; Klossa-Kilia *et al.*, 2006; Parmekelis *et al.*, 2008; Poulakakis & Sfenthourakis, 2008). Globally, these studies have shown incongruence between patterns obtained from molecular and morphological data, suggesting that the taxonomic level of some populations which show a large genetic divergence should be reevaluated. On the other hand, high levels of (mt)DNA structure may also be explained by the low dispersion capabilities of species, by biogeographical events and/or ecological specialization (Klossa-Kilia *et al.*, 2006; Parmekelis *et al.*, 2008).

The genus *Balloniscus* is composed by six nominal species: *B. nigricans* (Budde-Lund, 1885), *B. brevicornis* (Budde-Lund, 1885), *B. maculatus* (Budde-Lund, 1885), *B. paraguayanus* (Van Name, 1936), *B. glaber* (Araujo & Zardo, 1995) and *B. sellowii* (Brandt, 1833). Although Schmalfuss (2003) suggested that the first two species are distributed in Mississippi (USA,) Leistikow (2001) postulated that the records are unsubstantial. *B. paraguayanus* is distributed only in Paraguay, and *B. maculatus* in Central Argentina (Schmalfuss, 2003). Finally, *B. sellowii* shows a wide range distribution from Southern Brazil to Central Argentina, while *B. glaber* is endemic to Rio Grande do Sul, the southernmost state of Brazil (Quadros & Araujo, 2007). Furthermore, these two species show different habitat occupation. *B. sellowii* seems to be a habitat generalist, colonizing many different environments (Quadros *et al.*, 2008b), especially urban anthropic environments. On the other hand *B. glaber* is considered a habitat specialist, associated with remnants of the Atlantic Tropical Forest, one of the most threatened

Neotropical biomes (Quadros *et al.*, 2008a). Also, Araujo & Zardo (1995) provide the description of *B. glaber* pointing out some morphological characters to distinguish both species.

At Rio Grande do Sul, *B. glaber* occurs specifically in habitats through the Coastal Plain of Southern Brazil in sympatry with *B. sellowii*. This area is an elongate (620 km) and wide (up to 100 km) physiographic province which covers about 33.000 km² (Tomazelli *et al.*, 2000). This region extends from Chuí (Rio Grande do Sul) to Santa Marta Cape (Santa Catarina) (Villwock, 1994). Like other coastal regions the Coastal Plain from Southern Brazil can be viewed as a highly dynamic area from the standpoint of historical geography. Periodic oscillations in climate and habitat availability, especially during the last glacial age, have had profound effects on the distribution and evolutionary histories of many biological groups (Hewitt, 1996; Knowles, 2001).

Due to the reasons cited above, we focused in this study at investigating the evolutionary relationships among populations of *B. sellowii* and *B. glaber* in the Coastal Plain of Rio Grande do Sul, Brazil, using citochrome-oxidase subunit *I* (*COI*) sequences to estimate the level of genetic structure among them, and to contribute to the knowledge about their taxonomic status.

Material and methods

Collection

Individuals of *B. glaber* and *B. sellowii* were hand collected in soil, placed in 100% ethanol and kept refrigerated until DNA extraction. Eight populations of *B. glaber* and fourteen populations of *B. sellowii* were sampled in the Coastal Plain of Rio Grande do Sul, Brazil (Figure 1B and Table 1).

DNA extraction

Total genomic DNA was obtained from different parts of the body including reproductive (ovaries and utricles), nerve and muscular tissue of fixed individuals by Chelex (Bio-Rad) method. Dissection procedures were performed under sterile conditions as previously described (Bouchon *et al.*, 1998).

COI amplification, purification and sequencing

Partial sequences of mitochondrial locus *COI* were obtained from 188 individuals using primers LCO (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') and HCO (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994), yielding a product of 680 bp. The PCR was carried out in a volume of 25 μ l, using 12.5 ng of total DNA, 0.125 U of *GoTaq* (Promega), 1x *GoTaq* buffer (Promega), 5 μ M of each primer, and 0.2 mM of dNTPs. The PCR reaction mix was prepared in one batch and then added to each sample. PCR cycling conditions were 35 cycles (50 sec at 95°C, 50 sec at 55.5°C, 50 sec at 72°C), including an initial denaturing step of 95°C for 5 min, and a final extension step of 72°C for 5 min. For *B. sellowii*, annealing temperature was set to 61°C. The same primers were used to amplify a partial *COI* sequence of *A. vulgare* from BRI under the same conditions described for *B. glaber*. To check PCR success and the size of the amplified product 5 μ l of the PCR reaction product were run on a 1.5% agarose gel. PCR products were purified using Exosap-IT (Amersham Biosciences). Whenever possible, both strands have been sequenced to eliminate ambiguities. Sequencing was performed using BigDye v3.1 and an ABI 3130 Genetic Analyser. All different haplotypes were deposited in

Genbank-EMBL databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) under the accession numbers XXXXXX-XXXXXX (Table 1).

Phylogenetic and statistical analysis

DNA sequences were aligned using CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) and the alignment was visually inspected using the BIOEDIT program (Hall, 1999). All sequences were compared and only different haplotypes were kept for phylogenetic analysis. To test for saturation in the 3rd codon position, the uncorrected pairwise *p*-distance was computed considering 1st+2nd codon positions and then plotted against the *p*-distance obtained with the 3rd codon position. The resulting graph (data not shown) suggested that despite its large degree of variation, the 3rd position is not saturated and therefore all sites were included in the phylogenetic analysis.

The phylogeny of all *Balloniscus* COI haplotypes was estimated using two different methods. Initially we used the Maximum likelihood (ML) method implemented in PAUP*4.10b (Swofford, 2003) using the GTR+G+I evolutionary model, as suggested under the Akaike information criterion (AIC; Akaike, 1974) in MODELTEST 3.7 (Posada & Crandall, 1998; Posada & Buckley, 2004). Trees were evaluated through a heuristic search with tree bisection and reconnection (TBR) branch swapping. The support for each grouping was assessed after 500 bootstrap replications using heuristic search and nearest-neighbor interchange (NNI) swapping algorithm. We also used a Bayesian inference method implemented in MRBAYES v3.1 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), in which we partitioned the dataset in codon positions and allowed different evolutionary models for each (GTR+G+I, HKY+G+I, GTR+G+I, respectively). Alternative topologic hypotheses

were tested using the Shimodaira-Hasegawa test (Shimodaira & Hasegawa, 1999) with 1,000 replications in the program PAUP*4b10 (Swofford, 2003).

For a more direct comparison of the genetic distances among the main clades identified in the phylogenetic analysis with other published studies we estimated the net genetic distances among groups means using the Kimura two-parameter model with gamma correction with a shape parameter of 0.18 (not shown), which is the weighted estimate for all gamma models in MODELTEST 3.7. Genetic distances were calculated with the program MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

Population genetic analysis

To characterize and compare mitochondrial genetic diversity within populations, we computed several genetic diversity statistics in the program ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005), such as the number of haplotypes (N_h) and of polymorphic sites (S), haplotype (H) and nucleotide diversity (π), and Tajima's D and Fu's F_s neutrality statistics. Additionally, to estimate the level of genetic structure present in our data we used an Analysis of Molecular Variance (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992) for four different population groupings. Such different arrangements were designed to test 1) the general level of genetic structure; 2) the level of genetic structure explained by dividing the populations in the two recognized species; 3) and 4) the level of genetic structure explained by dividing the populations in two alternative ways according to the clades suggested from the phylogenetic analysis. The level and significance of a correlation between genetic and geographic distance was performed through a Mantel test (Mantel, 1967), implemented in the software Alleles in Space 1.0 (Miller, 2005).

Results

COI data

From 188 individuals analyzed, three were excluded. One *B. sellowii* individual from SLS showed a haplotype much more similar to *A. vulgare* than to other *Balloniscus* haplotypes. This sequence was considered as a contaminant, and was therefore excluded from the analysis. Additionally, two individuals showed COI sequences associated with the other terrestrial isopods genus as *Benthana*, *Ligia* and *Idotea* (sequences from GeneBank which were not included in our analysis). Specifically, one female of *B. glaber* from ABE showed the same haplotype found in several *B. sellowii* individuals from CSU and BRI. The other case involved one female of *B. sellowii* from ABE, which showed the same haplotype (haplotype 8) found in several *B. glaber* individuals from ABE as well. While we cannot exclude the possibility that such “trans-specific” haplotypes occur by hybridization between both species (noteworthy, one such case involves both species in the same geographic site), we decided to exclude such individuals from all population analysis.

For the remaining 185 individuals, we analyzed 624 nucleotide sites, 231 (37.0%) of which were variable (not considering the *A. vulgare* outgroup haplotype). We were able to characterize 63 different haplotypes, 60 being population-specific. The two most common haplotypes (H2 and H19) were represented in 14.05% of the sequenced individuals. Very interestingly, these haplotypes are shared, H2 in *B. glaber*, and H19 in *B. sellowii*, among the same set of three populations: PEL, CZ3 and CAS. Considering all samples, haplotype and nucleotide diversity were, respectively, 0.971 ± 0.004 and 0.108 ± 0.052 , respectively, with values of 0.964 ± 0.005 and 0.095 ± 0.046 for *B. sellowii* and 0.858 ± 0.033 and 0.013 ± 0.007 for *B. glaber*. A summary of genetic diversity statistics per locality is shown in Table 2. As a whole, neutrality tests do not suggest consistent

departures from a neutral model. It is apparent from Table 2 that some populations result in a significant negative value for Tajima's D. However, Fu's Fs statistic is not significant for any population, which may indicate that such significant results are not biologically meaningful.

The ML tree is shown in Figure 2A. The Bayesian tree (BI) (only posterior probabilities are shown) was identical to the ML tree, but some nodes present in the ML tree which had low bootstrap support had high posterior probabilities. In both phylogenetic analyses, four well-supported clades were identified (Figure 2A), corresponding to three groups of *B. sellowii* populations and one group of *B. glaber* populations throughout Coastal Plain of southern Brazil. Clade I comprised *B. sellowii* populations of the coastal region from the north boundaries of the Coastal Plain of Rio Grande do Sul (MCO) to the south portion (CID, TAV and CAS), including two populations on the southwestern margin of the Patos Lagoon (CZ3 and PEL) and a single haplotype from TAP, in the northwestern margin of the Patos lagoon (ML bootstrap value/ BI posterior probability = 96/1.00, respectively). Based on BI analysis and on the topology of the ML tree, ABE, GLO and PAL haplotypes could be tentatively included in clade I (BI posterior probability = 1.00). Clade II consists of *B. sellowii* populations from western and northern surrounds of Patos Lagoon (TAP and POA, respectively) (ML bootstrap value/ BI posterior probability = 99/1.00, respectively). Clade III comprised *B. sellowii* populations from western surrounds of Patos Lagoon and another population outside of Coastal Plain limits (BRI and CSU, respectively) (ML bootstrap value/ BI posterior probability = 97/1.00, respectively). Finally, clade IV comprised all *B. glaber* populations located across the Coastal Plain (ML bootstrap value/ BI posterior probability = 98/1.00, respectively).

Interestingly, SLS haplotypes did not fall in any of these clades and are found in two different parts of the tree: three haplotypes are found in the base of the tree, while two other haplotypes, together with one haplotype found in the neighbor CZ3 population are more internal. However, a SH test fail to reject both the hypothesis that the more basal SLS haplotypes are sister to a further split *B. sellowii* vs. *B. glaber* ($p= 0.553$) (Figure 2B), as well as the hypothesis that both species are monophyletic ($p= 0.146$) (Figure 2C).

The net average genetic distance among *Balloniscus* clades and the two group of SLS ranged from 5.8% (between SLS_{BASAL} and SLS_{INTERNAL}) to 13% (between clade III and clade IV), suggesting these distances are among those predicted for a single species of terrestrial isopods (Table 3).

In agreement with the fact that there is some geographic structuring in the clades suggested in the phylogenetic analysis, Mantel test showed a significant and positive associated of genetic and geographic distances for all samples ($r = 0.157$, $p = 0.001$), or considering either only *B. glaber* ($r = 0.125$, $p = 0.012$) or *B. sellowii* ($r = 0.279$, $p = 0.001$). Despite the significant association, however, the value for the correlation coefficient is low, with r^2 values ranging from 0,016 to 0,078 meaning that geographic distance alone explains only a minor portion of the overall variation in genetic distance.

For the AMOVA analyses (Table 4), we tested four different arrangements (AMOVA 1-4; Table 4). Noteworthy, the separation of the populations according to species provides a relatively weak structuring of the total genetic variation. As expected, grouping the populations according to the clades suggested by the phylogenetic analysis, accounts for most of the structuring of the observed genetic diversity. It is interesting, however, that AMOVA results can be interpreted as supporting the finding that ABE, PAL

and GLO populations of *B. sellowii* are separated from the remaining populations which form clade I, as shown in Figure 2.

Discussion

Both phylogenetic approaches (ML and BI) indicated complex relationships among *B. sellowii* and *B. glaber* populations across Coastal Plain of southern Brazil based on COI sequences. In both analyses we observed four major clades (three *B. sellowii* clades and one *B. glaber* clade). The topology of the ML tree and the general results of genetic diversity at the species level could suggest that *B. glaber* actually represents only part of the genetic variation contained in a complex of *B. sellowii* clades. However, SH tests cannot reject the hypothesis that both species are reciprocally monophyletic.

The clustering of these populations in different clades may be related to the geological history of Coastal Plain in Southern Brazil. This recent geologic region was formed in the Pleistocene and Holocene (from 400 ky) after successive cycles of marine regressions and transgressions which formed four geological “barriers” (Villwock, 1989). In particular, clades I and IV seem to be tightly associated with the Coastal Plain. The fact that for *B. sellowii* MCO is the more basal population in clade I could suggest a fast north-south recolonization of the Coastal Plain once the most recent areas were formed. Moreover, it is likely that this region have been colonized from the region known as “Coxilha das Lombas”, which is situated in the northeast of Guaíba Lake and extends over 78 km to Barros Lagoon. This region is close to the populations ABE, PAL, and GLO, and which was formed just after the first cycle of marine transgression-regression (Vilwock, 1983). Strikingly, the most basal haplotype in clade IV (*B. glaber*) and the sister haplotypes to clade I (*B. sellowi*) are from these regions (ABE), what suggests a common

biogeographic event affecting both species. Another common pattern for the two species is the haplotype sharing among PEL, CZ3 and CAS. These populations are in relative close proximity, and a common pattern for both species suggests that such haplotype sharing does reflect an evolutionary link among these populations. However, it is difficult to explain the haplotype 37 from TAP in the clade I and the other *B. sellowii* clades using biogeographic patterns, especially the link between BRI and CSU, distant 136 km apart, and in different geologic regions. A possible phenomenon that could account for this pattern is passive dispersion. *B. sellowii* is associated with rural and urban anthropized environments and may be carried by man to other places, as happens with other terrestrial isopod species like *Armadillidium vulgare* (Garthwaite *et al.*, 1995). In such cases, individuals from one population may be introduced in another population from a completely different evolutionary background, creating artificial phylogeographic patterns. A more detailed sampling will be necessary to a better understanding of the real phylogeographic patterns in this region.

Comparing both species, it is apparent that *B. glaber*, whose COI haplotypes are contained in a single clade, have a general pattern of genetic diversity very different from that in *B. sellowii*. There is much less genetic diversity and much less genetic structure. One possible explanation for these facts is based on distribution of both species. While *B. sellowii* is widespread from southeast Brazil to central Argentina, *B. glaber* is endemic of the Coastal Plain of Southern Brazil. Based on the recent geologic origin of this region, we could hypothesize that *B. glaber* is a recent species which originated from a *B. sellowii* population became isolated in the Coastal Plain. Even though, our results cannot refute the alternative hypothesis that COI lineages from both species are reciprocally monophyletic, it is difficult to account for the observed genetic diversity in both species without postulate

that *B. glaber* is a more recent species. For example, the lower diversity in this species could be explained by a smaller population size, which would reduce the coalescence times, but it is unlikely that this scenario, for a species with limited dispersal, would also originate the low geographic structure observed.

Intriguing patterns arise in SLS, which show very divergent haplotypes, which seem to cluster in two different position in the tree. One possibility is that this region represents some sort of refuge area in which more genetic variation was maintained. Alternatively, this area could contain a new species, which are inflating the level of diversity identified to *B. sellowii*. However, the present sample size is small, and a better characterization of this population will be necessary for testing these alternative hypotheses. For the genus *Balloniscus* Araujo & Zardo (1995), based on morphological characters, described *B. glaber* as a new species, and our data is compatible with this notion. However, well-defined species of terrestrial isopods usually show genetic distances ranging from 13% - 28% (Rivera *et al.*, 2002) and based on this range the status of some nominal species of terrestrial isopods has been redefined (Klossa-Kilia *et al.*, 2006; Parmakelis *et al.*, 2008; Poulakakis & Sfentourakis, 2008). In our study, the maximum distances were in the lower limit of this range (13%) and observed between clade III (*B. sellowii*) and clade IV (*B. glaber*). While this also supports the taxonomic status of *B. glaber*, it might suggest that, instead of different species, SLS population actually represents the most basal lineages in *B. sellowii*.

Haplotype diversity and nucleotide divergence of *Balloniscus* sequences were variable throughout the sampled populations, with a high level of population-specific haplotypes. Despite of genetic variation may be explained by demographic events, inherited cotransmitted micro-organisms such as *Wolbachia* may influence the population

genetics of the host's mtDNA through linkage-disequilibrium. Thus it may alter the (mt)DNA genetic diversity and structure by hitchhiking (Hurst & Jiggins, 2005). Terrestrial isopods are known to harbor *Wolbachia*, an alpha proteobacteria symbiont found mainly in reproductive tissues of its hosts (Bouchon *et al.*, 1998; Cordaux *et al.*, 2001, Ben Hafia Hatira *et al.*, 2008; Wiwatanaratanabutr *et al.*, 2009). SLS population showed the highest level of haplotype diversity and nucleotide divergence (see Table 2). Moreover, the six COI sequences of SLS did not grouped with any clade. This population is the most infected by *Wolbachia* among *B. sellowii* populations (Almerão *et al.*, *in press*) with at least two strains occurring in this site. The alteration of (mt)DNA polymorphism by *Wolbachia* was already investigated in many species and it depends of several factors as recency of infection and multiple infections in populations (Ahrens & Shoemaker, 2005; Hurst & Jiggins, 2005). In the case multiple infections, some studies showed different strains associated with different (mt)DNA haplotypes and it may introduce artefacts in mitochondrial genealogies (Hurst & Jiggins, 2005).

Acknowledgments

We also thank to Capes for the scholarship to MPA and Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular-UFRGS and to CNPQ for the research fellowship to AMA and PBA.

References cited

Ahrens ME, Shoemaker DD. 2005. Evolutionary history of *Wolbachia* infections in the fire ant *Solenopsis invicta*. *BMC Evolutionary Biology* 5: 35.

- Akaike H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transaction on Automatic Control* 19: 716-723.
- Araujo PB, Zardo MCL. 1995. Uma nova espécie de *Balloniscus* Budde-Lund (Crustacea, Isopoda, Balloniscidae) do sul do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 12: 785-790.
- Ben Afia Hatira H, Charfi Cheikhrouha, F, Bouchon D. 2008. Preliminary results on the infection status of terrestrial isopods in Tunisia by bacteria of *Wolbachia* genus. *Proceedings of 7th International Symposium of Terrestrial Isopod Biology* Shaker Verlag, Aachen, pp 1-13.
- Bouchon D, Rigaud T, Juchault P. 1998. Evidence for wide-spread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proceedings of the Royal Society of London B* 265: 1081-1090.
- Charfi -Cheikhrouha F. 2003. Genetic diversity in the mitochondrial 16S rDNA among five populations of *Armadillidium pelagicum* (Isopoda, Oniscidea). In: Sfenthourakis S, Araujo PB, Hornung E, Schmalfuss H, Taiti S and Szlavecz, K (eds) *The Biology of Terrestrial Isopods*, pp 365-380.
- Cordaux R, Michel-Salzat A, Bouchon D. 2001. *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. *Journal of Evolutionary Biology* 14: 237- 243.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evololutonary Bioinformatics Online* 1: 47-50.

- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.
- Garthwaite R, Lawson R, Sassaman C. 1995. Population genetics of *Armadillidium vulgare* in Europe and North America. *Crustaceans Issues* 9: 145-199.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hewitt GM. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of Linnean Society* 58: 247-276.
- Hurst GD, Jiggins FM. 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society of London B* 272: 1525-1534.
- Klossa-Kilia E, Kiliadis G, Tryfonopoulos G, Koukou K, Sfenthourakis S, Parmakelis A. 2006. Molecular phylogeny of the Greek populations of the genus *Ligidium* (Isopoda, Oniscidae) using three mtDNA gene segments. *Zoological Scripta* 35: 459-472.
- Knowles LL. 2001. Did the Pleistocene glaciations promote divergence? Tests of explicit refugial models in montane grasshoppers. *Molecular Ecology* 10: 691-701.
- Leistikow A. 2001. Phylogeny and biogeography of South American Crinocheta, traditionally placed in the family 'Philosciidae' (Crustacea: Isopoda: Oniscidea). *Organisms Diversity and Evolution* 4: 1-85.
- Marcade I, Souty-Grosset C, Bouchon D, Rigaud T, Raimond R. 1999. Mitochondrial DNA variability and *Wolbachia* infection in two sibling woodlice species. *Heredity* 83: 71-78.

- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Mattern D. 2003. New aspects in the phylogeny of the Oniscidea inferred from molecular data. In: Sfenthourakis S, Araujo PB de, Hornung E, Schmalfuss H, Taiti S, Szlavecz, K, eds. *The Biology of Terrestrial Isopods 2*: 23-37.
- Michel-Salzat A, Bouchon D. 2000. Phylogenetic analysis of mitochondrial LSU rRNA in oniscids. *Comptes Rendus de l Academie des Sciences Paris* 323: 827-837.
- Miller MP. 2005. Alleles in Space: computer software for the joint analysis of inter-individual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* 96: 722-724.
- Parmakelis A, Klossa-Kilia E, Kiliadis G, Triantis KA, Sfenthourakis S. 2008. Increased molecular divergence of two endemic *Trachelipus* (Isopoda, Oniscidea) species from Greece reveals patterns not congruent with current taxonomy. *Biological Journal of Linnean Society* 95: 362-370.
- Posada, D, Crandall KA. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Posada D, Buckley TR. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of the AIC and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology* 53: 793-808.
- Poulakakis N, Sfenthourakis S. 2008. Molecular phylogeny and phylogeography of the Greek populations of the genus *Orthometopon* (Isopoda, Oniscidea) based on mitochondrial DNA sequences. *Zoological Journal of Linnean Society* 152: 707-715.
- Quadros AF, Araujo PB. 2007. Ecological traits of two neotropical oniscideans (Crustacea: Isopoda). *Acta Zoologica Sinica* 53: 241-249.

- Quadros AF, Araujo PB, Sokolowicz C. 2008a. In: Zimmer M, Charfi-Cheikhrouha F and Taiti S (eds.). Reproduction of Neotropical isopods (Crustacea: Oniscidea) in southern Brazil: similarities and differences to temperate and tropical species. 1st edition. *Proceedings of 7th International Symposium of Terrestrial Isopod Biology*, Shaker Verlag, Aachen, pp 81-90.
- Quadros AF, Caubet Y, Araujo PB. 2008b. Life-history of two terrestrial isopods and the dichotomy specialist-generalist. *Acta Oecol* 35: 1-7.
- Rivera MAJ, Howarth FG, Taiti S, Roderick GK. 2002. Evolution in Hawaiian cave-adapted isopods (Oniscidea: Philosciidae): vicariant speciation or adaptive shifts? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25: 1-9.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Schmalzfuss H. 1989. Phylogenetics in Oniscidea. *Monitore Zoologico Italiano* 4: 3-27.
- Schmalzfuss H. 2003. World catalog of terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea). *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde* 654: 1-341.
- Schmidt C. 2002. Contribution to the phylogenetic system of the Crinocheta (Crustacea, Isopoda). Part 1. (Olibrinidae to Scyphacidae s. str.). *Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin, Zoologische Reihe* 78: 275-352.
- Shimodaira H, Hasegawa M. 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1114-1116.
- Swofford DL, 2003. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b10. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.

- Taiti S, Arnedo MA, Lew SE, Roderick GK. 2003. In: Sfenthourakis S, Araujo PB, Hornung E, Schmalfluss H, Taiti S and Szlavecz K (eds). Evolution of terrestriality in Hawaiian species of the genus *Ligia* (Isopoda, Oniscidea). *The Biology of Terrestrial Isopods 2*: 85-102.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882.
- Tomazelli LJ, Dillemburg SR, Villwock JA. 2000. Late quaternary geological history of Rio Grande Sul coastal plain, southern Brazil. *Revista Brasileira de Geociências* 30: 470-472.
- Villwock JA. 1983. Geological aspects of the coastal province of RS. A synthesis. *Pesquisas* 16: 5-49.
- Villwock JA. 1989. Summary of the geology of the coastal province of Rio Grande do Sul. *Proceedings of SIUEC* 2: 471-484.
- Villwock JA. 1994. A costa brasileira: geologia e evolução. *Notas Técnicas* 7: 38-49.
- Wägele J. 1989. Evolution und phylogenetische Systematik der Isopoda. *Zoologica* 47: 1-262.
- Wiwatanaratnabutr I, Kittayapong P, Caubet Y, Bouchon D. 2009. Molecular Phylogeny of *Wolbachia* Strains in Arthropod Hosts Based on groE-Homologous Gene Sequences. *Zoological Science* 26: 171-177.

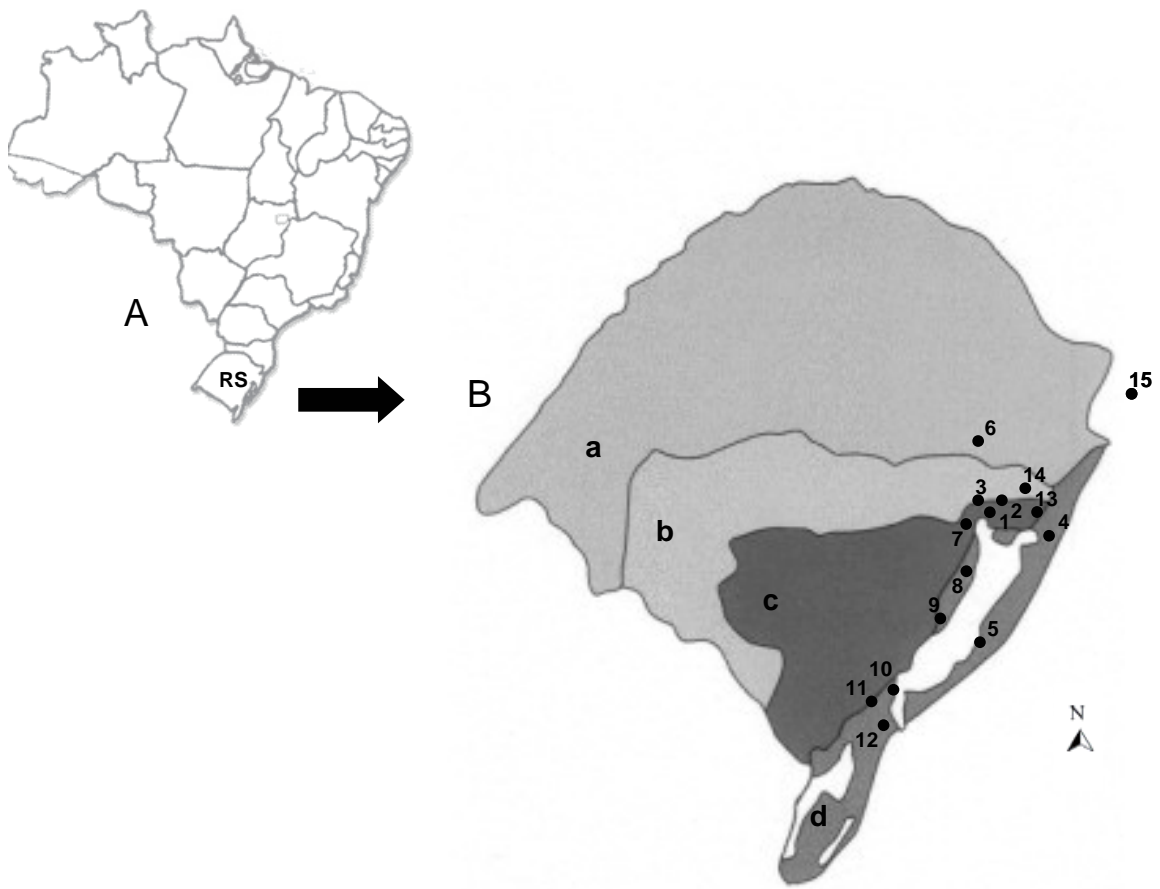


Figure 1. Map of study area. A: Map of Brazil (RS: state of Rio Grande do Sul); B: Geological regions of Rio Grande do Sul (a: Upland; b: Peripheral Depression; c: Sul Riograndense Shield; d: Coastal Plain). Collection sites: 1, POA (Porto Alegre); 2, ABE (Águas Belas); 3, MSA (Morro Santana); 4, CID (Cidreira); 5, TAV (Tavares); 6, CSU (Caxias do Sul); 7, BRI (Barra do Ribeiro); 8, TAP (Tapes); 9, SLS (São Lourenço do Sul); 10, CZ3 (Colônia Z3); 11, PEL (Pelotas); 12, CAS (Cassino); 13, PAL (Palmares do Sul); 14, GLO (Glorinha); 15, MCO (Morro dos Conventos).

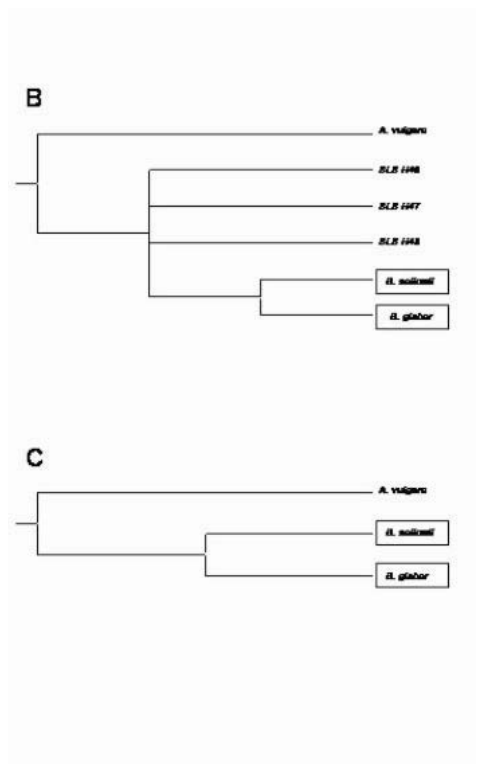
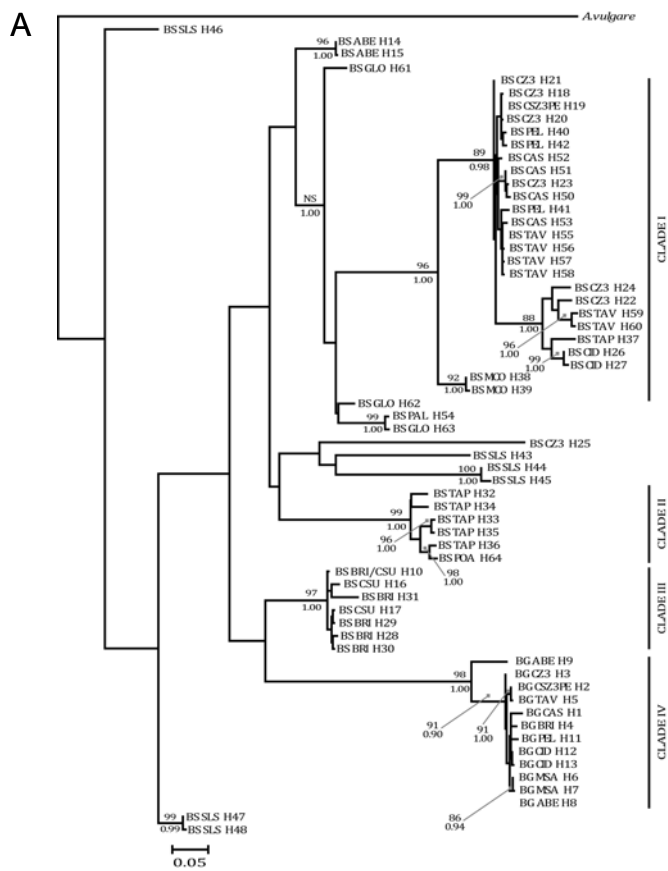


Figure 2. A: Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree obtained from portions of cytochrome oxidase subunit I (COI) nucleotides of 64 haplotype sequences of *Balloniscus* species. *Armadillidium vulgare* sequence was used as the outgroup (accession number) Numbers at nodes indicate bootstrap values and posterior probabilities in the ML and Bayesian inference tree, respectively. NS denotes nodes that were not supported. BG and BS denotes species (*Balloniscus glaber* and *B. sellowii*, respectively) preceding by population code (see Table 1) and haplotype number. Sidebars indicate clades I-IV. GeneBank accession numbers of *Wolbachia* strains: (accession numbers). B-C: Alternative phylogeny topologies considering SLS haplotypes (H46, H47 and H48) as sister clade of *Balloniscus sellowii* and *B. glaber* and considering the reciprocal monophily of both species. Retangles indicates that all populations are considered.

Table1. List of *Balloniscus glaber* and *B. sellowii* populations, map codes and GenBank accession numbers

Species	Population	Map code	Geographical coordinates	N	H	Accession number
<i>B. glaber</i>	Cassino (CAS)	13	S32°10'14.8'' WO 52°10'21.4''	6	H1/H2	Accession number
<i>B. glaber</i>	Colônia Z3 (CZ3)	11	S31°40'54.2'' WO 51°52'01.7''	5	H3	Accession number
<i>B. glaber</i>	Barra do Ribeiro (BRI)	8	S30°39'19.3'' WO 51°23'13.1''	2	H4	Accession number
<i>B. glaber</i>	Tavares (TAV)	6	S31°17'06.4'' WO 51°05'34.7''	6	H5	Accession number
<i>B. glaber</i>	Morro Santana (MSA)	3	S30°01'43.3'' WO 52°46'29.8''	5	H6-H7	Accession number
<i>B. glaber</i>	Águas Belas (ABE)	2	S30°02'10.6'' WO 51°01'10.5''	10	H8/H9	Accession number
<i>B. glaber</i>	Pelotas (PEL)	12	S31°25'59.5'' WO 51°37'44.2''	5	H11	Accession number
<i>B. glaber</i>	Cidreira (CID)	4	S30°08'44.5'' WO 50°19'44.4''	5	H12/H13	Accession number
<i>B. sellowii</i>	Águas Belas (ABE)	2	S30°02'10.6'' WO 51°01'10.5''	12	H8/H14/H15	Accession number
<i>B. sellowii</i>	Caxias do Sul (CSU)	7	S29°10'11.4'' WO 52°49'14.2''	13	H10/H16/H17	Accession number
<i>B. sellowii</i>	Colônia Z3 (CZ3)	11	S31°40'54.2'' WO 51°52'01.7''	18	H18-H25	Accession number
<i>B. sellowii</i>	Cidreira (CID)	4	S30°08'44.5'' WO 50°19'44.4''	8	H26/H27	Accession number
<i>B. sellowii</i>	Barra do Ribeiro (BRI)	8	S30°39'19.3'' WO 51°23'13.1''	8	H28-H31	Accession number
<i>B. sellowii</i>	Tapes (TAP)	9	S30°40'16.5'' WO 52°36'07.3''	8	H32-H37	Accession number
<i>B. sellowii</i>	Morro do Conventos (MCO)	16	S28°56'24.8'' WO 49°21'37.5''	11	H38/H39	Accession number
<i>B. sellowii</i>	Pelotas (PEL)	12	S31°25'59.5'' WO 51°37'44.2''	7	H40-H42	Accession number
<i>B. sellowii</i>	São Lourenço do Sul (SLS)	10	S30°02'10.6'' WO 51°01'10.5''	6	H43-H48	Accession number
<i>B. sellowii</i>	Cassino (CAS)	13	S32°10'14.8'' WO 52°10'21.4''	10	H50-H53	Accession number
<i>B. sellowii</i>	Palmares do Sul (PAL)	14	S30°15'50.8'' WO 50°30'29.0''	9	H54	Accession number
<i>B. sellowii</i>	Tavares (TAV)	6	S31°17'06.4'' WO 51°05'34.7''	11	H55-H60	Accession number
<i>B. sellowii</i>	Glorinha (GLO)	15	S29°54'58.4'' WO 50°49'15.1''	10	H61-H63	Accession number
<i>B. sellowii</i>	Porto Alegre (POA)	1	S30°01'43.3'' WO 52°46'19.8''	12	H64	Accession number

N: Number of sequences per population; H: Haplotypes submitted to the GenBank

Table 2. Population genetic diversity and divergence estimates for different *Balloniscus* populations based on COI sequences

Species	Population	Nseq	Nsit	Nh	S	H (\pm sd)	π % (\pm sd)	D_{taj}	$FsFu$	Φ_{ST}
<i>B. glaber</i>	Morro Santana (MSA)	5	621	2	1	0.40 \pm 0.24	0.06 \pm 0.08	-0.82	0.09	0.913
<i>B. glaber</i>	Águas Belas (ABE)	9	621	2	42	0.39 \pm 0.16	2.83 \pm 1.58	0.29	13.64	0.894
<i>B. glaber</i>	Cidreira (CID)	5	624	2	1	0.40 \pm 0.24	0.06 \pm 0.08	-0.82	0.09	0.913
<i>B. glaber</i>	Barra do Ribeiro (BRI)	4	624	1	0	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	NV	NV	0.913
<i>B. glaber</i>	Tavares (TAV)	6	624	1	0	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	NV	NV	0.913
<i>B. glaber</i>	Colônia Z3 (CZ3)	5	617	2	3	0.40 \pm 0.24	0.20 \pm 0.17	-1.05	1.69	0.913
<i>B. glaber</i>	Pelotas (PEL)	5	623	2	11	0.40 \pm 0.24	0.72 \pm 0.50	-1.2	4.48	0.910
<i>B. glaber</i>	Cassino (CAS)	6	624	2	14	0.33 \pm 0.22	0.77 \pm 0.50	-1.47*	5.3	0.910
<i>B. sellowii</i>	São Lourenço do Sul (SLS)	6	612	6	132	1.00 \pm 0.10	11.79 \pm 6.87	0.77	1.37	0.809
<i>B. sellowii</i>	Caxias do Sul (CSU)	13	624	3	13	0.64 \pm 0.10	0.89 \pm 0.05	1.23	6.33	0.909
<i>B. sellowii</i>	Barra do Ribeiro (BRI)	8	624	5	27	0.89 \pm 0.09	1.42 \pm 0.83	-0.92	2.02	0.906
<i>B. sellowii</i>	Porto Alegre (POA)	12	624	1	0	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	NV	NV	0.913
<i>B. sellowii</i>	Tapes (TAP)	8	624	6	95	0.93 \pm 0.08	5.70 \pm 3.17	-0.53	3.57	0.872
<i>B. sellowii</i>	Morro do Conventos (MCO)	11	624	2	2	0.33 \pm 0.15	0.11 \pm 0.10	-0.13	1.45	0.913
<i>B. sellowii</i>	Cidreira (CID)	8	623	2	3	0.25 \pm 0.18	0.12 \pm 0.11	-1.44*	1.41	0.913
<i>B. sellowii</i>	Tavares (TAV)	11	607	6	40	0.73 \pm 0.14	2.15 \pm 1.18	-0.46	3.34	0.900
<i>B. sellowii</i>	Colônia Z3 (CZ3)	18	624	8	113	0.64 \pm 0.13	3.31 \pm 1.71	-1.78*	6.15	0.885
<i>B. sellowii</i>	Pelotas (PEL)	7	617	4	14	0.81 \pm 0.13	0.74 \pm 0.47	-1.19	1.49	0.910
<i>B. sellowii</i>	Cassino (CAS)	10	624	5	19	0.82 \pm 0.10	1.23 \pm 0.71	0.59	2.74	0.907
<i>B. sellowii</i>	Glorinha (GLO)	10	623	3	42	0.51 \pm 0.16	2.30 \pm 1.28	-0.35	9.81	0.901
<i>B. sellowii</i>	Águas Belas (ABE)	11	624	2	1	0.55 \pm 0.07	0.09 \pm 0.09	1.44	1.17	0.913
<i>B. sellowii</i>	Palmares do Sul (PAL)	9	624	1	0	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	NV	NV	0.913
<i>B. glaber</i>	All populations	43	622	12	58	0.86 \pm 0.03	1.33 \pm 0.70	-1.36	2.52	0.910**
<i>B. sellowii</i>	All populations	142	624	51	223	0.96 \pm 0.01	9.47 \pm 4.56	1.52	10.68	0.897**
<i>Balloniscus</i>	All populations	185	623	63	231	0.97 \pm 0.00	10.8 \pm 5.20	2.21	11.9	0.902**

Nseq: Number of sequences; Nsit: Number of sites; Nh: Number of haplotypes; S: Number of polymorphic sites; H: Haplotype diversity; π : Nucleotide diversity; D_{taj} : Value of Tajima's neutrality test; $FsFu$: Value of Fu's neutrality test; Φ_{ST} : Values of Φ_{ST} ; *significant values; ** average values; NV: Not variable;

Table 3. Net genetic distances (Kimura 2-parameter) of COI sequences among four *Balloniscus* major clades and two groups of divergence sequences (SLS population)

	1	2	3	4	5
Clade I (1)					
Clade II (2)	0.092				
Clade III (3)	0.075	0.100			
Clade IV (4)	0.110	0.111	0.129		
SLS1 (5)	0.068	0.081	0.078	0.110	
SLS 2 (6)	0.060	0.065	0.067	0.088	0.057

Table 4. Analysis of Molecular Variance for four different population groupings among *Balloniscus* populations

Source of variation	AMOVA 1	AMOVA 2	AMOVA 3	AMOVA 4
AG	90.16	62.19	72.63	80.75
APWG	-	31.22	19.72	10.89
WP	9.84	5.99	7.65	8.36
Φ_{ST}	0.96	0.94	0.92	0.92

AG: Among groups; APWG: Among populations within groups; WP: Within populations; Φ_{ST} : Values of Φ_{ST} .
 AMOVA arrangements: 1 (all *Balloniscus* clades); 2 (clade IV x clade I+II+III+SLS clade); 3 (clade IV x SLS clade x clade II x clade III x clade I); 4 (clade IV x SLS clade x clade II x clade III x clade I x GLO+ABE+PAL); - : Not calculated

Almerao MP, Fagundes NJR, Araujo PB, Verne S, Grandjean F, Bouchon D and Araujo AM
First record of *Wolbachia* in South American terrestrial isopods: prevalence and high diversity
in two species of *Balloniscus* (Crustacea: Oniscidea)
Current Microbiology (a ser submetido)

CAPÍTULO 3

First record of *Wolbachia* in South American terrestrial isopods: prevalence and high diversity in two species of *Balloniscus* (Crustacea: Oniscidea)

ALMERAO, MP¹, FAGUNDES, NJR¹, ARAUJO, PB.², VERNE, S.^{3,4}, GRANDJEAN, F.³
BOUCHON, D³ AND ARAUJO, AM¹.

1- Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, IB, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, C. Postal 15053, 91501-970, Poro Alegre, RS, Brasil

2- Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Departamento de Zoologia, IB, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Poro Alegre, RS, Brasil

3-Laboratoire Ecologie, Evolution, Symbiose, Université de Poitiers, UMR CNRS 6556, Poitiers, France

4- Department of Forest Sciences, University of British Columbia, #3225 - 2424 Main Mall, Vancouver BC V6T-1Z4, Canada

Abstract

Wolbachia is endosymbiotic bacteria that commonly infect arthropods. These bacteria induce a number of phenotypes in their hosts, including cytoplasmic incompatibility, thelytokous parthenogenesis, feminization, and male killing. We surveyed two native South American isopods populations of the genus *Balloniscus* for *Wolbachia* infections by using a diagnostic polymerase chain reaction assay (16S rDNA gene). Overall, 16 new strains were observed in populations distributed along the Coastal Plain of Rio Grande do Sul. Based on a population approach, we observed variation in intra and interspecific prevalences. On average, the prevalence was higher in *B. glaber* than in *B. sellowii* populations. All strains were grouped in supergroup B, in which all *Wolbachia* strains found in terrestrial isopods are situated. However, the topologies indicated alternative routes for horizontal transmission of *Wolbachia* found in both *Balloniscus* species.

Introduction

Wolbachia are maternally transmitted alpha-proteobacteria known to infect a wide range of arthropods and nematodes (Bandi et al., 1998; Werren & O'Neill, 1997). They are found in germ line and somatic tissues (O'Neill et al., 1997; Werren, 1997; Bandi et al., 1998).

Depending on both bacterial lineage and host, they may have different effects on host

reproduction, such as cytoplasmic incompatibility (O'Neill & Karr, 1990; Breeuwer & Werren, 1990), male killing (Hurst et al., 1999a), parthenogenetic reproduction (Stouthamer, 1997; Zchori-Fein et al., 2001) or feminization of genetic males (Juchault et al., 1994; Bouchon et al. 1998). Therefore, these bacteria may have a strong influence on the evolution of the host populations. Several strategies are currently in use for the identification of *Wolbachia* strains, such as the Multi Locus Sequence Typing (MLST) approach (Baldo et al., 2006; Paraskevopoulos et al., 2006), and the sequencing of other *Wolbachia* genes. Previous analyses based on *ftsZ*, a gene involved in cell division; *wsp*, a gene encoding a surface protein (Lo et al., 2002; van Meer et al., 1999); and the 16S rDNA gene (Bandi et al., 1999; Vanderkerchove et al., 1999) suggested that current *Wolbachia* strains comprise eight Supergroups (A-H), even though the relations among them are not well established (Lo et al., 2007). It is possible that at least in some cases, exchanges of genetic material between *Wolbachia* strains may account for the observed relations between supergroups (Baldo et al., 2005). For example, Supergroup G is composed by strains infecting spiders and there are some evidences indicating that in fact this supergroup is formed by recombination between strains of Supergroups A and B (Baldo & Werren, 2007).

Terrestrial isopods species (Crustacea, Oniscidea) are widely infected by *Wolbachia* (Bouchon et al., 1998; 2008). Bouchon et al. (1998) screened eight of the major oniscidean families, for which nineteen species were infected. Lately six uninfected species tested in this study were positive in other assays. Thus, *Wolbachia* prevalence in terrestrial isopods is approximately 61% (Bouchon et al., 2008). However, accurate estimates of the prevalence of *Wolbachia* are difficult, and both under or overestimates may happen. Some authors claimed that underestimation is caused by: (1) absence of population sampling (not all populations are infected), and because (2) infected and uninfected individuals often coexist in the same population (Cook & Butcher, 1999; Hilgenboecker et al., 2008). For terrestrial isopods, Verne et al. (*in press*) found that prevalence in females ranged from 0 to 100% in eleven French

populations of *Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804) (four hundred individuals sampled). In a meta-analysis of infected populations, the frequency of symbiotic females ranges from 5 to 74% (Bouchon et al. 2008). These authors observed that *Wolbachia* prevalence was higher than that found in other studies in France with the same species (Rigaud et al., 1999; Juchault et al., 1993 and Cordaux et al., 2004). On the other hand, overestimation may result from false positives in PCR's surveys (Li et al., 2007). In *Callosobruchus chinensis* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera) it was observed that *wsp* and *ftsZ* were amplified by PCR, but *groE* (Baldo et al., 2006) and 16S rDNA were not detected (Kondo et al., 2002), a result that may be explained if an exchange of genetic material between the bacteria and the insect host occurred (Hotopp et al., 2007; Nikoh et al., 2008; Klasson et al., 2009; Woolfit et al., 2009). Thus, even if an individual does not have *Wolbachia* as endosymbiont, it may produce a positive PCR reaction if it harbors the piece of *Wolbachia* genome fragment that are targeted by the PCR survey, and this phenomenon may overestimate the overall prevalence.

Based on 16S rDNA and *ftsZ* sequences, all *Wolbachia* strains from terrestrial isopods belong to the Supergroup-B, corroborated by the *wsp* and *groE* phylogeny and these phylogenies suggest that *Wolbachia* strains found in terrestrial isopods form a polyphyletic clade with the majority of strains grouped in the *Oniclade* ((Bouchon et al., 1998; Cordaux et al., 2001; Wiwatanaratnabutr et al., 2009).

Although terrestrial isopods are long time known to be prone to sex distortion (review in Bouchon et al. 2008) and *Wolbachia* is known to infect terrestrial isopods since 1992 (Rousset et al., 1992), no South American endemic species have been investigated up to now for prevalence, and genetic diversity of *Wolbachia* strains. *Balloniscus glaber* Araujo & Zardo, 1995 is endemic and restricted to the southernmost state of Brazil, Rio Grande do Sul, where it occurs associated with remnants of the Brazilian Atlantic Forest. Due to deforestation, fragmentation, and replacement by exotic species in this biome (Morellato & Haddad, 2000), *B. glaber* is susceptible to extinction (Quadros et al, 2008b). On the other hand, *B. sellowii* is a species with wide

distribution (which overlaps with that of *B. glaber*), occurring from Southern Brazil to Uruguay and Argentina (Lemos de Castro, 1976) where it is often associated with anthropized environments and exotic forests (Araujo et al., 1996).

Here, we present the first description of *Wolbachia* infection in two South American species of terrestrial isopods, specifically in *Balloniscus glaber* and *B. sellowii*. We show that there is evidence of cross-specific transmission in at least one instance, that both species are infected by several bacteria strains, which sometimes coexists in a single population, and that for both species there is a high level of genetic variation in the *Wolbachia* strains.

Material and methods

Collection

Individuals of *B. glaber* and *B. sellowii* were hand collected in soil, placed in 100% ethanol and kept refrigerated until DNA extraction. Nine populations of *B. glaber* and twelve populations of *B. sellowii* were sampled in the Coastal Plain of Rio Grande do Sul, Brazil (Figure 1; Table 1). This area is an elongate (620 km) and wide (up to 100 km) physiographic province which covers about 33.000 km² (Tomazelli et al., 2000).

DNA extraction

Total genomic DNA was obtained from different parts of the body including reproductive (ovaries and utricles), nerve and muscular tissue of fixed individuals by Chelex[®] (Bio Rad) method. Dissection procedures were performed under sterile conditions as previously described (Bouchon et al., 1998).

Assay for *Wolbachia*

The presence of *Wolbachia* was carried out by PCR assay with *Wolbachia*-specific primers for 16S rDNA (O'Neill et al., 1992). Failure of amplification with the general 16S

rDNA primers could be due to either: (i) absence of *Wolbachia*; (ii) failure in DNA extraction procedure; and/or (iii) incorrect concentration of DNA solution (Werren *et al.*, 1995a). In order to control for the last two possibilities, we tested the samples scored as negatives with primers for the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene (COI) region (Folmer *et al.*, 1994). Samples yielding a product of expected size were considered to be true negatives for *Wolbachia* assay. Additionally, we tested four other *Wolbachia* genes (*groE*, *dnaA*, *ftsZ* and *wsp*) using PCR, and each of them showed different results for *Wolbachia* detection. Furthermore, we tested five and ten individuals of two sympatric populations of exotic isopods species (*Armadillidium vulgare* and *A. nasatum* Budde-Lund, 1885, respectively) for all genes cited above.

PCR methods, purification and sequencing

We amplified most of the *Wolbachia* 16S rDNA gene using the *Wolbachia*-specific primers 99F 5'- TTGTAGCCTGCTATGGTATAACT - 3' and 994R 5' - GAATAGGTATGATTTTCATGT - 3' (O'Neill *et al.*, 1992), which yield a product of around 900bp. The PCR was carried out in a volume of 25 µl, using 12.5 ng of total DNA, 0.125 U of *GoTaq* (Promega), 1x *GoTaq* buffer (Promega), 5 µM of each primer, and 0.2 mM of dNTPs. The PCR reaction mix was prepared in one batch and then added to each sample. PCR cycling conditions were 35 cycles (1 min at 95°C, 1 min at 50.6°C, 1 min at 72°C), including an initial denaturing step of 95°C for 2 min, and a final extension step of 72°C for 5 min. After PCR, 5 µl of the reaction product were run on 1.5% agarose gel to check PCR success and size of the amplified DNA. PCR products were purified using Exosap-IT (Amersham Biosciences). Sequencing was performed using BigDye v3.1 and an ABI 3130 Genetic Analyser. All sequences were deposited in Genbank-EMBL databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) under the accession numbers XXXXXX-XXXXXX (Table 1).

Sequence Polymorphism and Phylogeny construction

DNA sequences were aligned using Clustal X (Thompson et al., 1997) and the alignment was visually inspected using the BioEdit program (Hall, 1999). The *Wolbachia* sequences obtained in this study were also aligned with other 16S rDNA sequences representative of the other Supergroups obtained from the GeneBank, including those used by Bouchon et al. (1998) and Lo et al. (2002). We used AMOVA (Excoffier et al., 1992) using Arlequin 3.1 (Excoffier et al., 2005) to assess how the total genetic variation (measured by Φ_{ST}) is partitioned between species, among local populations within each species, and within local populations.

The phylogeny of all *Wolbachia* strains was estimated using the Maximum likelihood (ML) method implemented in PAUP*4.10b (Swofford, 2003) using the GTR+ Γ evolutionary model as suggested under the AIC criterion in Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998; Posada & Buckley, 2004). Trees were evaluated through a heuristic search with tree bisection and reconnection (TBR) branch swapping. The support for each grouping was assessed after 200 bootstrap replications using heuristic search and nearest-neighbor interchange (NNI) swapping algorithm. We also used a Bayesian method implemented in Beast 1.4.7 (Drummond & Rambaut, 2007), in which the tree-space and the parameter space are analyzed simultaneously running a MCMC for 50,000,000 steps based on the GTR+ Γ model, on a Yule speciation process, and assuming a lognormal relaxed molecular clock (Drummond et al., 2006). To test if the best topology was significantly better than a topology in which we forced all strains infecting *Balloniscus* species to form a monophyletic group, we carried out a Shimodaira-Hasegawa test (SH) (Shimodaira & Hasegawa, 1999) and also evaluated the Bayes factor (BF) of the alternative hypotheses (Suchard et al., 2005).

Finally, we constructed a median-joining network (Bandelt et al., 2000) to check the number of mutated nucleotide positions defining each grouping, as well as to have a better resolution of the genetic diversity within the sequences from the Supergroup B. The

medianjoining network was constructed in the Network 4.1.1.2 program (<http://www.fluxus-engineering.com>).

Results

Wolbachia global prevalence and incidence in *B. glaber* and *B. sellowii*

In the *Wolbachia* genes assay, out of twenty positives for 16S rDNA, we observed only ten, six, four and two positives for *groE*, *dnaA*, *ftsZ* and *wsp*, respectively. Based on these findings we concluded that the 16S rDNA seems to be the most sensitive gene for *Wolbachia* detection in *Balloniscus* species using a PCR assay. Of 254 individuals of *B. glaber* were sampled in nine populations and tested for the presence of *Wolbachia* in which 99 infected individuals (Table 2) were detected. A total of 265 individuals of *B. sellowii* were sampled in 12 populations and 42 of them were infected (Table 2). *B. glaber* showed a higher prevalence in females (77;48%) than in males (22; 23%); Fisher's exact test; $p < 0.001$ for a 1:1 ratio). No such difference was found between males (12; 13%) and females (30;17%) of *B. sellowii* (Fisher's exact test, $p = 1.00$). Also, *B. glaber* has also a higher frequency of infection than *B. sellowii* (Fisher's exact test, $p < 0.001$). *Wolbachia* was found in 7 of 9 populations of *B. glaber* and in 8 of 12 populations of *B. sellowii* suggesting that *Wolbachia* incidence is not different between these species (Fisher's exact test; $p = 0.65$). Overall, no infected individual was found in 4 of the 15 sampling sites (ABE, PEL, PAL and CSU). *B. glaber* and *B. sellowii* were symtopic in two of all uninfected populations (ABE and PEL), while in the remaining two (PAL and CSU) only *B. sellowii* individuals were observed.

Wolbachia strain diversity and distribution

The comparison of the 16S rDNA sequences (Figure 2) showed that 16 new *Wolbachia* strains were observed in both *Balloniscus* species studied here. Among these, three strains were exclusive of *B. glaber* and thus named wGla1, wGla2 and wGla3, and 11 were exclusive of *B.*

sellowii and named *wSel1*, *wSel2*, *wSel3*, *wSel4*, *wSel5*, *wSel6*, *wSel7*, *wSel8*, *wSel9*, *wSel10*, *wSel11*. Furthermore, two strains were shared by both species *wBal1* and *wBal2*. *Wolbachia* sequence found in *A. nasatum* BRI is the same found in European populations (*wNas*). All *Wolbachia* strains were named according Zhou *et al.* (1998) and further specified by Charlat *et al.* (2002).

The distribution of the *Wolbachia* strains seems to be not random across the *B. glaber* populations of the Patos Lagoon surroundings. Indeed, we observed *wGla1* on the western portion (BRI, CZ3 and CAS), *wBal2* in the northern portion (MSA), *wGla3* in the northeastern portion (CID) and both *wGla2* and *wBal1* in the eastern portion (MOS and TAV). The *Wolbachia* prevalence in *B. glaber* ranged from low to high prevalence (respectively 0.11, 0.60 and 0.87 for *wGla2*, *wGla1* and *wGla3*; see Table 2).

Similarly to *B. glaber*, the strains found in *B. sellowii* were generally specific of one sampling site, except *wSel7*, and *wSel9* which were observed in CID/GLO and TAP/SLS respectively. Four of the eight infected populations (CZ3, SLS, POA and GLO) hosted two strains and one of them (TAP) hosted three strains although no evidence of co-infections in a single individual has been found. In all these cases in which we found two strains per population, the overall prevalence (coexisting strains considered as a whole) was low to medium. However, according to the sample size it was difficult to determine the relative prevalence of each strain. The populations BRI, CAS and CZ3 both hosted a single strain, and showed the lowest prevalence (respectively 0.19, 0.06 and 0.13).

The two strains shared by both species *wBal1* and *wBal2*, showed low to medium prevalences. In the first case, prevalence was 0.22 (both species considered) and in the second one, only considering prevalence in MSA population, it was in average 0.22. Strain *wBal2* was also observed in the CZ3 population, but for the same reason explained for other *B. sellowii* strains, its prevalence in CZ3 was not estimated.

Wolbachia polymorphism and phylogeny

We used AMOVA to assess and test which are the factors that explain *Wolbachia* diversity in *B. glaber* and *B. sellowii*. In our dataset, the species level accounts for 24% of the total variation, while populations within each species account for 54.09% of the total variation. The remaining genetic variation is accounted for 21.91% within the local populations.

Maximum likelihood (ML) analyses of the 16S rDNA sequences (Figure 3) indicated that *Balloniscus* strains were grouped in the Supergroup B, which together with Supergroup A, E, F and G consist of the *Wolbachia* strains found in arthropod hosts (Lo et al., 2007). While most strains from other terrestrial isopods group in a subclade named Oniclade (see Cordaux et al., 2001), which received good bootstrap support (87), all *Balloniscus* strains fall outside the Oniclade, in a second cluster of Supergroup B strains (bootstrap support of 85).

Interestingly, the strains obtained from *Balloniscus* species do not form a monophyletic group. The tree obtained with the Bayesian method is essentially identical to the ML tree. The main difference is that the strains of the Supergroup A (with one exception) group together with the strains of the supergroup E (data not shown). The exception is the Supergroup A strain from *Phlebotomus papatasi* Scopoli, 1786 which is sister to the whole Supergroup B in both analysis. Because the non-monophyly of *Balloniscus* strains could be indicative of multiple infections occurring along the evolutionary history of these species, we tested the rejection of the topology in which we enforced the monophyly of all *Balloniscus* strains. Different methods resulted in conflicting outcomes. While the SH test indicates that the hypothesis of monophyly for *Balloniscus* strains cannot be rejected ($p = 0.113$), the Bayesian analysis resulted in a BF of 2.763 in favor of the non-monophyly hypothesis. Such value is considered to be strong evidence in favor of one specific hypothesis (Kass & Raftery, 2005). Finally, the median-joining network (Figure 2) also seems to support a scenario of multiple infections, since the three groups of *Balloniscus* strains are separated by a series of mutations shared with strains

found in other species, such that forcing their monophyly would necessarily invoke a number of recurrent mutations.

Discussion

Wolbachia is a maternally inherited endosymbiont, being common in terrestrial isopods (Bouchon et al., 1998; Cordaux et al. 2001, Ben Hafia Hatira et al., 2008; Bouchon et al. 2008; Wiwatanaratnabutr et al., 2009), and having a widespread occurrence, infecting some North African, some North-American, Southeast Asia and several European populations. Our results present the first record of *Wolbachia* occurrence in South American species of terrestrial isopods, showing the highest *Wolbachia* diversity among terrestrial isopods.

Our findings were based on *Wolbachia* 16S rDNA gene which is largely used to detect *Wolbachia* polymorphism (Werren et al., 1995b; Bouchon et al., 1998; Vandekerckhove et al., 1999; Rowley et al., 2004; Bordenstein & Rosengaus, 2005). The comparison of the detection rates found for other *Wolbachia* genes tested strongly suggested that the 16S rDNA gene was more sensitive for *Wolbachia* detection, at least in *Balloniscus* species. So we decided to use it, even considering that it is less polymorphic than other markers such as *wsp* (Schulenburg et al., 2000). Although this low polymorphism makes the detection of multiple infection difficult (Riegler & O'Neill, 2006), we found, in this study, a high diversity of *Wolbachia* strains especially for *B. sellowii* (13 strains). A high number of strains (five) were also observed for *B. glaber*. Up to now the highest *Wolbachia* diversity was found in *Culex pipiens* populations which hosts 66 different strains and in only one population up to ten different strains were identified (Duron et al., 2006). This high *Wolbachia* diversity was reported from a huge sampled area (Southern Europe, North Africa and Crete), which is much higher than our study area. Thus, it is possible that the *Balloniscus-Wolbachia* diversity is yet an underestimation of real *Wolbachia* diversity in both species. We think that not only in *B. sellowii* populations screened in this study, but in other *Balloniscus*-populations, the *Wolbachia* diversity may be yet

higher. For terrestrial isopods species a maximum of three strains was described for *A. vulgare* (Cordaux et al., 2004; Verne et al. 2007) and *Porcellionides pruinosus* (Michel-Salzat et al., 2001), even though for these species several populations were checked in a wide geographic range.

All phylogenetic analyses showed that *Balloniscus* strains were grouped outside the Oniclade, which contains most of the *Wolbachia* strains found in terrestrial isopods. At present, only a single strain infecting a terrestrial isopod species (in Europe) has been found outside this clade (*P. pruinosus*, wPru1 in Cordaux et al., 2001). The observed global phylogenetic pattern suggests a different evolutionary history of the *Wolbachia* in South American host species. However, as this is the first investigation in South American terrestrial isopods we cannot exclude the presence of an Oniclade in South America.

Concerning the origins of the *Wolbachia* strains in *Balloniscus*, the monophyly of these strains have not been supported based on BF, even though the SH test could not reject the hypothesis of monophyly. One explanation for such conflicting results is that because the branch lengths are small, the SH test does not have much power to reject the null hypothesis of monophyly. On the other hand, the BF is calculated after integrating over the parameter space and the tree space, which may be more efficient to contrast both hypotheses (Suchard et al., 2005). In support for this interpretation, it is evident from the network that forcing the monophyly of *Balloniscus* would require invoking several recurrent mutations. Although our results suggest that the *Wolbachia* strains currently found in *Balloniscus* have multiple origins, it is worth to present a possible infection routes from these data. Apparently, we could divide the *Balloniscus-Wolbachia* strains in two major groups: group 1, composed by two *Balloniscus glaber-Wolbachia* strains (wGla1 and wGla2), one strain found in both species (wBal1) and the other host species and group 2, composed by one *Balloniscus glaber-Wolbachia* strain (wGla3), the other strain found in both species (wBal2) and *B. sellowii-Wolbachia* strains, except wSel1 which could be placed in both groups. Thus, we hypothesized that in group 1, *Balloniscus-*

Wolbachia strains diverged among them and infected first *B. glaber* through other host species (Fig. 2B). Then, *Wolbachia* probably spread in *B. sellowii* population (Fig. 2B). Unfortunately, infections and its routes in South American species are poorly known and other investigations must be done to support this idea.

The phylogenetic analyses also showed that globally in *Balloniscus-Wolbachia* strains a phylogeographical pattern was observed in which each population harbor its own *Wolbachia* strain through the Coastal Plain of Rio Grande do Sul. The exceptions were *wGla1* found in three different populations and some *Balloniscus sellowii-Wolbachia* that showed complex relationships.

Furthermore, *wSel8* found in SLS was close to *wSel7* observed in GLO and *wSel9* also observed in TAP was close to other two strains observed in this location (*wSel10* and *wSel11*). The second strain observed in GLO (*wSel3*) is close to the only strain observed for *B. sellowii* in CAS (*wSel2*). These complex relationships may be explained by the fact that *B. sellowii* is associated with rural and urban environments and may be carried by man (passive dispersion) to other places, as other terrestrial isopod species (e.g. *A. vulgare*, Garthwaite et al., 1995). This feature may introduce new infected individuals that harbor other *Wolbachia* strains in a population already infected.

Interestingly, of the four populations where *B. glaber* and *B. sellowii* were syntopic (CZ3, CID, BRI and TAV), in only one case (TAV), both species shared the same *Wolbachia* strain (*wBal1*). Probably this finding can be explained by horizontal transmission of *Wolbachia* strain between two species (Werren et al., 1995a; Vavre et al., 1999; Cordaux et al., 2001). In addition, considering that this strain is closely related to the strain found in a neighboring area (MOS), and exclusively in *B. glaber*, the most likely scenario is that the infection occurred from *B. glaber* to *B. sellowii*. In the other three localities (BRI, CZ3 and CID), however, have such pattern is less clear, suggesting that other routes and mechanisms may be involved to account for the presence of *Wolbachia* in both species. Also, two strains (*wBal1*, *wBal2*) were observed for both

species in one (TAV) or two different populations (MSA and CZ3) and two or more strains infecting both species were observed in the same population several times (BRI, CAS, CID and CZ3). These results showed that *Wolbachia* is easily transferred between species as well as between populations

Our results showed variable *Wolbachia* prevalences among the *Balloniscus* populations, which could be influenced by several factors, such as deficiency in vertical transmission (Rigaud & Juchault, 1992), length of time of *Wolbachia* invasion (Shoemaker et al., 2003), array of *Wolbachia* strains within host populations and genetic differentiation among populations (Ahrens & Shoemaker, 2005), environmental conditions (Keller *et al.*, 2004) and some stochastic factors (Jansen et al., 2008). At present, these factors are yet unknown for *Wolbachia* strains in *Balloniscus* species and any discussion would be too speculative. Anyway, in global terms *B. glaber* was, in average, more infected than *B. sellowii*. This result may be mainly explained by $wGla1$ and $wGla3$, which have shown medium to high prevalences (0.60 and 0.87, respectively).

For two populations (ABE and PEL) where *B. glaber* and *B. sellowii* are syntopic we could not detect infection by *Wolbachia* in any individual. In addition, *Wolbachia* was not found in other two *B. sellowii* populations (PAL and CSU). Considering that there are many cases of *Wolbachia* horizontal transfer among species (Werren et al. 1995a, Vavre et al., 1999; Cordaux et al., 2001), one possible explanation for absence of infection in these populations would be the absence of the species that transferred *Wolbachia* to *Balloniscus* species. Also in some cases *Wolbachia* may be lost and it depends on the context of infection (Werren and Windsor, 2000; Reuter et al., 2005) and stochastic demographic factors (Rigaud et al 1992)

Despite *Wolbachia* effects in *Balloniscus* species are unknown two were already described in terrestrial isopods: feminization (Bouchon et al., 1998; Juchault et al., 1994; Martin et al., 1973) and cytoplasmic incompatibility (Legrand & Juchault, 1986; Moret et al., 2001). According to Bouchon et al. (1998), feminization probably occurs in species where intersex

individuals have been found. However, for both species, *B. glaber* and *B. sellowii* (field and laboratory observations), this type of individual has never been observed (Araújo & Zardo, 1995; Almerão et al. 2006; Meinhardt et al., 2007; Quadros & Araujo, 2008). Considering all strains, the frequency of infected females was higher for *B. glaber*, but no statistical difference between the frequencies of infected females and males was found for *B. sellowii*. For most of terrestrial isopods, presence of infected males may be due to host resistance to feminization (Bouchon et al., 1998) or because different species may show different levels of feminization (Rigaud et al., 1999). Concerning cytoplasmic incompatibility, crossing between infected and uninfected individuals are necessary to confirm this hypothesis (Legrand & Juchault, 1986; Moret et al., 2001). Despite one of these two *Wolbachia* effects may occur in *Balloniscus* species other *Wolbachia* effects (Weekes et al., 2002) are not discarded.

In conclusion, likewise other South American species (Shoemaker et al., 2000; Ciociola Jr et al., 2001; Ono et al., 2001; Selivon et al., 2002; Vega et al., 2002; Dittar & Whiting, 2004; Heukelbach et al., 2004; Rocha et al., 2005; Cònsoli & Katajima, 2006; Lo & Evans, 2007; Souza et al., 2009), *Wolbachia* also infects South American terrestrial isopods. A population-based approach detected more accurately the real prevalence rates in our study species in comparison with other approaches. This kind of approach allowed us to find a high diversity of *Wolbachia* strains, showing that terrestrial isopods, especially South American species may be an excellent model to investigate this interaction. Finally, more species (including species of other taxa) must be investigated to better understand *Wolbachia* evolutionary history in South America.

Acknowledgments

We thank to Catherine Debenest, Carine Delaunay, and Maryline Raimond for technical assistance. We also thank to Capes for the scholarship to MPA and Programa de Pós-Graduação

em Genética e Biologia Molecular-UFRGS and to CNPQ for the research fellowship to AMA and PBA.

References cited

- Ahrens ME, Shoemaker DD (2005) Evolutionary history of *Wolbachia* infections in the fire ant *Solenopsis invicta*. BMC Evol Biol 5:35
- Almerão MP, Mendonça Jr MS, Quadros AF, Pedó E, Rabaiolli LGS, Araujo PB (2006) Terrestrial isopod diversity in the subtropical Neotropics: Itapuã State Park, southern Brazil. Iheringia 96:473-477
- Araujo PB, Buckup L, Bond-Buckup G (1996) Isópodos terrestres (Crustacea, Oniscidea) de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Iheringia, Série Zoologia, 81:111-138
- Baldo L, Bordenstein S, Wernegreen JJ, Werren JH (2005) Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. Mol Biol Evol 23:437-449
- Baldo L, Dunning Hotopp JC, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MC, Tettelin H, Werren JH (2006) Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. Appl Environ Microbiol 72:7098-7110
- Baldo L, Werren JH (2007) Revisiting *Wolbachia* supergroup typing based on *wsp*: spurious strains and discordance with MLST. Curr Microbiol 55:81-87
- Bandelt HJ, Macaulay V & Richards M (2000) Median Networks: Speedy Construction and Greedy Reduction, One Simulation, and Two Case Studies from Human mtDNA. Mol Phylogenet Evol 16:8-28
- Bandi C, Anderson TJ, Genchi C, Blaxter ML (1998) Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. Proc R Soc Lond B 265:2407-2413
- Bandi C, Slatko B, O'Neill SL (1999) *Wolbachia* genomes and the many faces of symbiosis. Parasitol. Today 15:428-429

- Ben Afia Hatira H, Charfi Cheikhrouha. F and Bouchon D (2008) In: Zimmer M. Charfi-Cheikhrouha F and Taiti S (eds.). Preliminary results on the infection status of terrestrial isopods in Tunisia by bacteria of *Wolbachia* genus. 1st edition. Proc 7th Int Symp Terr Isopod Biol. Shaker Verlag. Aachen. pp 1-13.
- Bordenstein S, Rosengaus RB (2005) Discovery of a novel *Wolbachia* super group in Isoptera. *Curr Microbiol* 51:393-398
- Bouchon D, Rigaud T, Juchault P (1998) Evidence for wide-spread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc R Soc Lond B* 265:1081-1090
- Bouchon D, Cordaux R, Grève P (2008) Feminizing *Wolbachia* and the evolution of sex determination in isopods. In: Bourtzis K, Miller T (eds) *Insect Symbiosis*. vol. 3. Boca Raton, CRC Press, pp 273-294
- Breeuwer JAJ, Werren JH (1990) Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature* 346:558-560
- Charlat S, Bourtzis K, Merot H (2002). *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. In: Seckbach J (ed) *Symbiosis: Mechanisms and Model Systems*. vol. 1. Boston, Kluwer Academic Press, pp 621-644
- Charlat S, Hornett EA, Dyson EA, Ho PPY, Loc NT, Schilthuizen M, Davies N, Roderick GK, Hurst GDD (2005) Prevalence and penetrance variation of male killing *Wolbachia* across Indo-Pacific populations of the butterfly *Hypolimnas bolina*. *Mol Ecol* 14:3525-3530
- Ciociola Jr, AI, Almeida RP, Zucchi RA, Stouthamer R (2001) Detecção de *Wolbachia* em uma população telítoca de *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae) via PCR com o *primer* específico *wsp*. *Neotrop Entomol* 30:489-491

- Cônsoli FL, Katajima EW (2006) Symbiofauna associated with the reproductive system of *Cotesia flavipes* and *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera, Braconidae). *Braz J morphol Sci* 23: 463-470
- Cook JM, Butcher RDJ (1999) The transmission and effects of *Wolbachia* bacteria in parasitoids. *Res Popul Ecol* 41:15-28
- Cordaux R, Michel-Salzat A, Bouchon D (2001) *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. *J Evol Biol* 14:237-243
- Cordaux R, Michel-Salzat A, Frelon-Raimond M, Rigaud T, Bouchon D (2004) Evidence for a new feminizing *Wolbachia* strain in the isopod *Armadillidium vulgare*: evolutionary implications. *Heredity* 93:78-84
- Dittmar K, Whiting MF (2004) New *Wolbachia* endosymbionts from nearctic and neotropical fleas (Siphonaptera). *J Parasitol*: 90:953-957
- Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLOS Biol* 4:699-710
- Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees. [<http://evolve.zoo.ox.ac.uk/beast/>]
- Duron O, Fort P, Weill M (2006) Hypervariable prophage WO sequences describe an unexpected high number of *Wolbachia* variants in the mosquito *Culex pipiens*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 273:495-502
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinfo Online* 1:47-50

- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:294-299
- Garthwaite R, Lawson R, Sassaman C (1995) Population genetics of *Armadillidium vulgare* in Europe and North America. *Crust Issues* 9:145-199
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95-98
- Heukelbach J, Bonow I, Witt, LH (2004a) High infection rate of *Wolbachia* endobacteria in the sand flea *Tunga penetrans* from Brazil. *Acta trop* 92:225-230
- Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH (2008) How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett* 281:215-220
- Hotopp JCD, Clark ME, Oliveira DC et al (2007) Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. *Science* 317:1753-1756
- Hurst GDD, Jiggins FJ, Schulenburg J, Bertrand D, West SA (1999) Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proc R Soc Lond B* 266:735-740
- Jansen VAA, Turelli M, Godfray HCJ (2008) Stochastic spread of *Wolbachia*. *Proc R Soc Lond B* 275:2769-2776
- Juchault P, Rigaud T, Mocquard JP (1993) Evolution of sex determination and sex ratio variability in wild populations of *Armadillidium vulgare* (Latr.) (Crustacea, Isopoda): a case study in conflict resolution. *Acta Oecol* 14:547-562
- Juchault P, Frelon M, Bouchon D, Rigaud T (1994) New evidence for feminizing bacteria in terrestrial isopods : evolutionary implications. *C R Acad Sci III* 317:225-230
- Kass RE, Raftery AE (1995) Bayes Factors. *J Am Stat Assn* 90:773-795
- Keller GP, Windsor DM, Saucedo JM, Werren JH (2004) Reproductive effects and geographical distributions of two *Wolbachia* strains infecting the Neotropical beetle, *Chelymorpha alternans* Boh. (Chrysomelidae, Cassidinae). *Mol Ecol* 13:2405-2420

- Klasson L, Kambris Z, Cook PE, Walker T, Sinkins SP (2009) Horizontal gene transfer between *Wolbachia* and the mosquito *Aedes aegypti* BMC Genomics 10:33
- Kondo N, Nikoh N, Ijichi N, Shimada M, Fukatsu T (2002) Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. Proc Natl Acad Sci USA 99:14280-14285
- Legrand JJ, Juchault P (1986) Rôle des bactéries symbiotiques dans l'intersexualité, la monogénie et la spéciation chez des crustacés oniscoïdes. Boll Zool 53:161-172
- Lemos de Castro A (1976) Considerações sobre a sinonímia e a distribuição geográfica de *Balloniscus sellowii* (Brandt, 1833) (Isopoda, Balloniscidae). Revta Bras Biol 36:392-391
- Li Z, Lin H, Guo X (2007) Prevalence of *Wolbachia* Infection in *Bemisia tabaci*. Curr Microbiol 54:467-471
- Lo N, Casiraghi M, Salati E, Bazzocchi, C, Bandi C (2002). How many *Wolbachia* supergroups exist? Mol Biol Evol 19:341–346
- Lo N, Evans TA (2007) Phylogenetic diversity of the intracellular symbiont *Wolbachia* in termites. Mol Phylogenet Evol 44:461-466
- Lo N, Paraskevopoulos C, Bourtzis K, O'Neill S L, Werren JH, Bordenstein SR, Bandi C (2007) Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. Int J Syst Evol Microbiol 57:654-657
- Martin G, Juchault P, Legrand JJ (1973) Mise en évidence d'un microorganisme intracytoplasmique symbiote de l'Oniscoïde *Armadillidium vulgare* L. dont la présence accompagne l'intersexualité ou la féminisation totale des mâles génétiques de la lignée théligène. C R Acad Sci III 276:2313-2316
- Meinhardt H, Quadros AF and Araujo PB (2007) Growth curve of *Balloniscus glaber* Araujo & Zardo (Crustacea, Isopoda, Oniscidea) from Parque Estadual de Itapuã, Rio Grande do Sul, Brazil. Rev Bras Zool 24:1108-1112

- Michel-Salzat A, Cordaux R, Bouchon D (2001) *Wolbachia* diversity in the *Porcellionides pruinosus* complex of species (Crustacea, Oniscidea): evidence for host-dependant patterns of infection. *Heredity* 87:428-434
- Morellato LPC, Haddad CFB (2000) Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* 32:786-792
- Moret Y, Juchault P, Rigaud T (2001) *Wolbachia* endosymbiont responsible for cytoplasmic incompatibility in a terrestrial crustacean: effects in natural and foreign hosts. *Heredity* 86:325-332
- Nikoh N, Tanaka K, Shibata F, Kondo N, Shimada M, Hizume M, Fukatsu T (2008) *Wolbachia* genome integrated in an insect chromosome: evolution and fate of laterally transferred endosymbiont genes. *Genome Res* 18:272–280
- O'Neill SL, Karr TL (1990) Bidirectional cytoplasmic incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature* 348:178-180
- O'Neill SL, Giordano R, Colbert AME, Karr TL, Robertson HM (1992) 16S rDNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *PNAS*. 94:2699-2702
- O'Neill SL, Hoffmann AA, Werren JH (1997) Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction. 1st edn. Oxford, Oxford University Press
- Ono M, Braig HR, Munstermann LE, Ferro C, O'Neill SL (2001) *Wolbachia* infections of phlebotomine sand flies (Diptera: Phlebotomidae). *J Med Entomol* 38:237-241
- Paraskevopoulos C, Bordenstein SR, Wernegreen JJ, Werren JH, Bourtzis K (2006) Toward a *Wolbachia* multilocus sequence typing system: discrimination of *Wolbachia* strains present in *Drosophila* species. *Curr Microbiol* 53:388-395
- Posada, D, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817-818

- Posada D, Buckley TR (2004). Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of the AIC and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst Biol* 53:793-808
- Quadros AF, Caubet Y, Araujo PB (2008) Life-history of two terrestrial isopods in relation to habitat specialization. *Acta Oecol* 35:243-249
- Reuter M, Keller L (2003) High levels of multiple infection and recombination of *Wolbachia* in the ant *Formica exsecta*. *Mol Biol Evol* 20:748-753
- Riegler M, O'Neill SL (2006) The genus *Wolbachia*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds) *The Prokaryotes*. vol. 1. Springer Science, pp 547-561
- Rigaud T, Juchault P (1992) Genetic control of the vertical transmission of a cytoplasmic sex factor in *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscidea). *Heredity* 68:47-52
- Rigaud T, Bouchon D, Souty-Grosset C, Raimond R (1999) Mitochondrial DNA Polymorphism, Sex Ratio Distorters and Population Genetics in the Isopod *Armadillidium vulgare*. *Genetics* 152:1669-1677
- Rocha LS, Mascarenhas RO, Perondini ALP, Selivon D (2005) Occurrence of *Wolbachia* in Brazilian samples of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) *Neotrop Entomol* 34:1013-1015
- Rousset F, Bouchon D, Pintureau B, Juchault P, Solignac M (1992) *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc R Soc Lond B* 250:91
- Rowley SM, Raven RJ, McGraw EA (2004) *Wolbachia pipientis* in Australian spiders. *Curr Microbiol* 49:208-214
- Selivon,D, Perondini ALP, Ribeiro AF, Marino CL, Lima MMA, Coscrato VE (2002) *Wolbachia* endosymbiont in a species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). *Invert Reprod Develop* 42:121-127

- Schmalfuss H (2003) World catalog of terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea). Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde A 654: 1-341
- Schulenburg, JHGVD., Hurst GDD, Huigens TME, van Meer MMM, Jiggins FM, Majerus MEN (2000). Molecular evolution and phylogenetic utility of *Wolbachia* *ftsZ* and *wsp* gene sequences with special reference to the origin of male-killing. Mol Biol Evol 17:584-600
- Shimodaira H, Hasegawa M (1999) Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. Mol Biol Evol 16:1114-1116
- Shoemaker DD, Ross KG, Keller L, Vargo EL, Werren JH (2000) *Wolbachia* infections in native and introduced populations of fire ants (*Solenopsis* spp.). Insect Mol Biol 9:661-673
- Shoemaker DD, Keller G, Ross KG (2003) Effects of *Wolbachia* on mtDNA variation in two fire ant species. Mol Ecol 12:1757-1771
- Souza RF, Ramalho JDS, Morini MSC, Wolff JLC, Araújo RC, Mascara D (2009) Identification and Characterization of *Wolbachia* in *Solenopsis saevissima* Fire Ants (Hymenoptera: Formicidae) in Southeastern Brazil. Curr Microbiol 58:189-194
- Stouthamer R (1997) *Wolbachia*-induced parthenogenesis. In: O'Neill S L, Hoffman, Werren JH (eds) Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction, vol. 1. Oxford, Oxford University Press, pp 102-124
- Suchard, M, Weiss RE, Sinsheimer JS (2005) Models for estimating Bayes factors with applications to phylogeny and tests of monophyly. Biometrics 61:665-673
- Swofford DL (2003) PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b10. Sinauer, Sunderland, Massachusetts
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools Nucleic Acids Res, 25:4876-4882

- Tomazelli LJ, Dillemburg SR, Villwock JA (2000) Late quaternary geological history of Rio Grande Sul coastal plain, southern Brazil. *Rev Bras Geociências* 30:470-472
- Vavre F, Fleury F, Lepetit D, Fouillet P, Bouletreau M (1999) Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol Biol Evol* 16:1711-1723
- Vega FE, Benavides P, Stuart JA, O'Neill SL (2002) *Wolbachia* infection in the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae). *Ann Entomol Soc Am* 95:375-378
- Verne S, Johnson M, Bouchon D, Grandjean F (2007) Evidence for recombination between feminizing *Wolbachia* in the isopod genus *Armadillidium*. *Gene* 397:58-66
- Vandekerchove TMT, Watteyne S, Willems A, Swings JG, Mertens J, 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 wolbachial taxonomy. *FEMS Microbiol Lett* 180:279-286
- van Meer MMM, Witteveldt J, Stouthamer R (1999) Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. *Insect Mol Biol* 8:399-408
- Weeks AR, Tracy Reynolds K, Hoffmann AA (2002) *Wolbachia* dynamics and host effects: what has (and has not) been demonstrated? *Trends Ecol Evol* 17:257-262
- Werren JH, Windsor DM, Guo L (1995a) Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proc R Soc Lond B* 262:197-204
- Werren JH, Zhang W, Guo L (1995b) Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc R Soc Lond B* 261:55-71
- Werren JH (1997) Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol* 42:587
- Werren JH, Windsor DM (2000) *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proc R Soc Lond B* 267:1277-1285

- Wiwatanaratnabutr I, Kittayapong P, Caubet Y, Bouchon D (2009) Molecular Phylogeny of *Wolbachia* Strains in Arthropod Hosts Based on groE-Homologous Gene Sequences. *Zool Sci* 26:171-177
- Woolfit M, Iturbe-Ormaetxe I, McGraw EA, O'Neill SC (2009) An Ancient Horizontal Gene Transfer between Mosquito and the Endosymbiotic Bacterium *Wolbachia pipientis*. *Mol Biol Evol* 26:367-374
- Zchori-Fein E, Gottlieb Y, Kelly SE, Brown JK, Wilson JM, Karr TL, Hunter MS (2001) A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. *PNAS* 98:12555-12560
- Zhou W, Rousset F, O'Neill SL (1998) Phylogeny and PCR based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. *Proc R Soc Lond B* 265:509-515

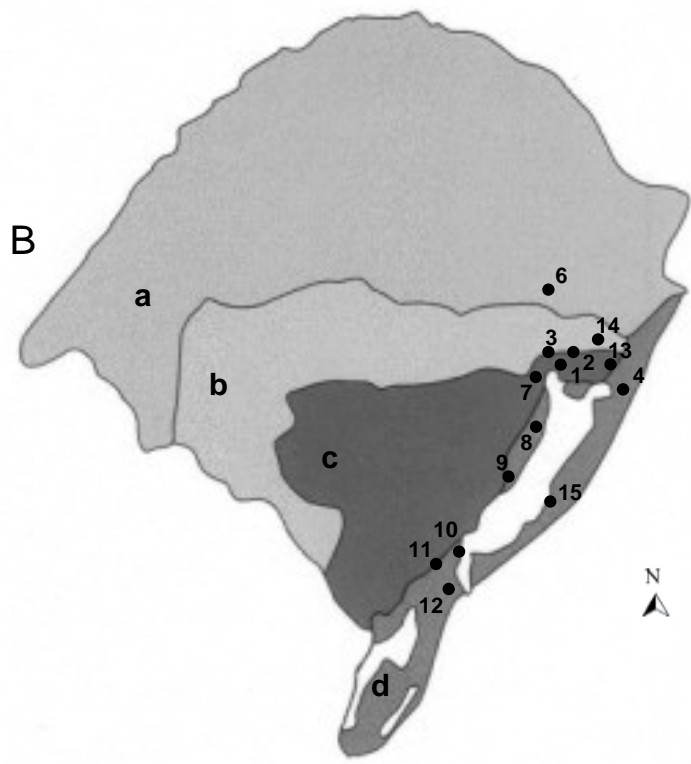


Figure 1. Map of study area. A: Map of Brazil (RS: Rio Grande do Sul state); B: Geological regions of Rio Grande do Sul (a: Upland; b: Peripheral Depression; c: Sul Riograndense Shield; d: Coastal Plain). Collections sites: 1, POA (Porto Alegre); 2, ABE (Águas Belas); 3, MSA (Morro Santana); 4, CID (Cidreira); 5, TAV (Tavares); 6, CSU (Caxias do Sul); 7, BRI (Barra do Ribeiro); 8, TAP (Tapes); 9, SLS (São Lourenço do Sul); 10, CZ3 (Colônia Z3); 11, PEL (Pelotas); 12, CAS (Cassino); 13, PAL (Palmares do Sul); 14, GLO (Glorinha); 15, MOS (Mostardas)

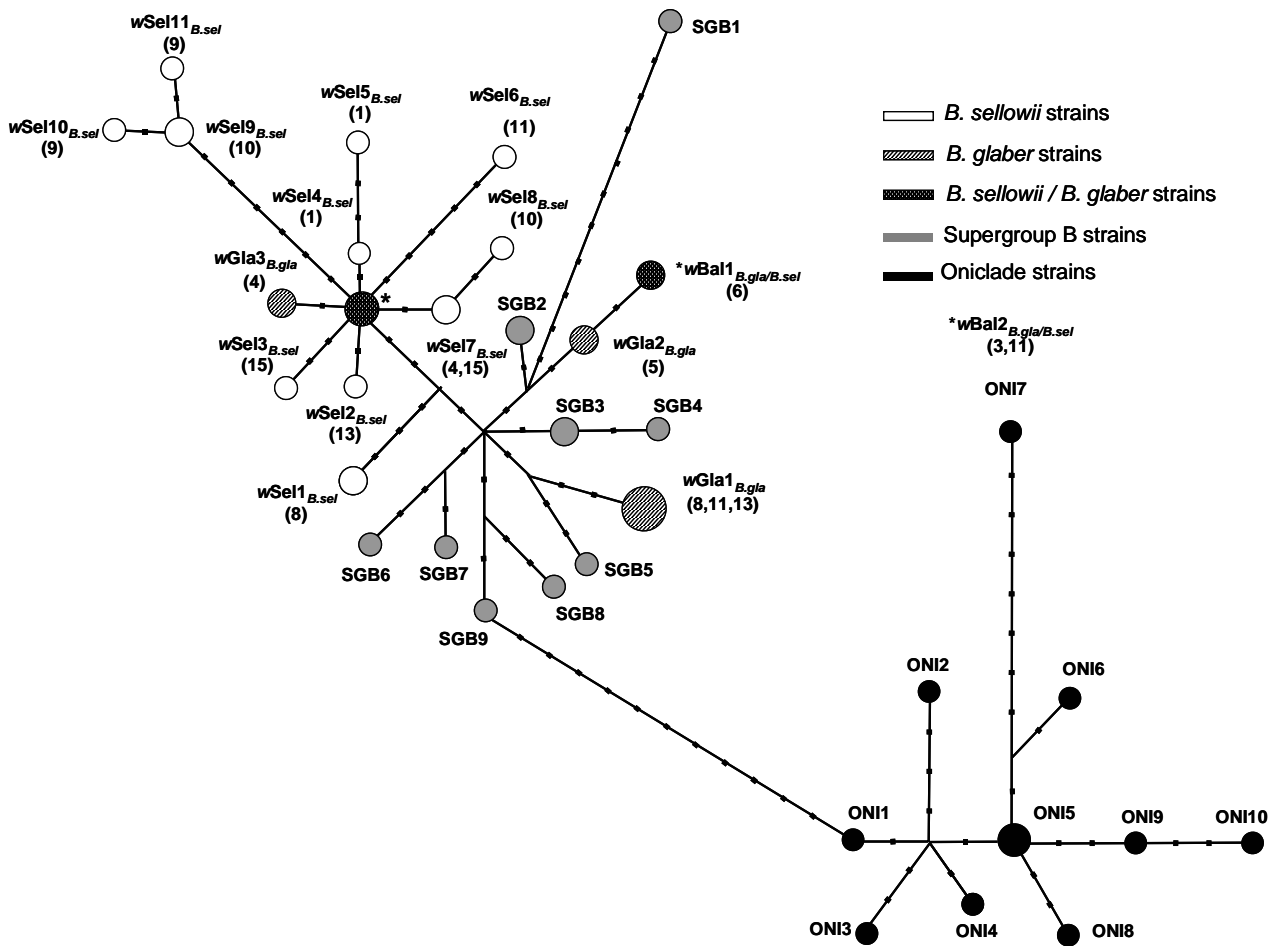


Figure 2. Median joining network of *Wolbachia* strains (haplotypes) strains in *Balloniscus* species based on 16S rDNA. Colours denote strains in three different groups (white, *Balloniscus* strains; grey, Supergroup B strains and black, Oniclade strains). Supergroup B strains (SG1, *Thecodiplosis japonensis*; SG2, *Gryllus rubens* (wG1) and *G. assimilis*; SG3, *Porcellionides pruinosus* (wpruIII) ; SG4, *Sphaeroma rugicauda* ; SG5, *Gryllus pensylvanicus* (wG2) ; SG6, *Culex pipiens* (wPip) ; SG7, *Drosophila simulans* Mont D'Ambre (wMa); SG8, *Trichogramma pretiosum*; SG9, *Asellus aquaticus*). Oniclade strains (ONI1, *Helleria brevicornis*; ONI2, *Porcellio scaber*; ONI3, *Phyloscia muscorum*; ONI4, *Ligia oceanica*; ONI5, *Armadillidium vulgare* (wvul), *A. album* (wAlbum), *A. nasatum* (wnas), *Porcellionides pruinosus* (wpruI) ; ONI6, *Armadillidium nasatum* BR; ONO7, *Porcellio dilatatus petiti*; ONI8, *Chaetophiloscia elongata*; ONI9, *Haplophthalmus danicus*; ONI10, *Cylisticus convexus* (wCc)). Circles denote relative number of sequences and are proportional to the number of sequences. Lines and squares between strains denote mutational steps. Numbers (between parentheses) above *Balloniscus* strains denote locations. GeneBank accession numbers of *Wolbachia* strains.

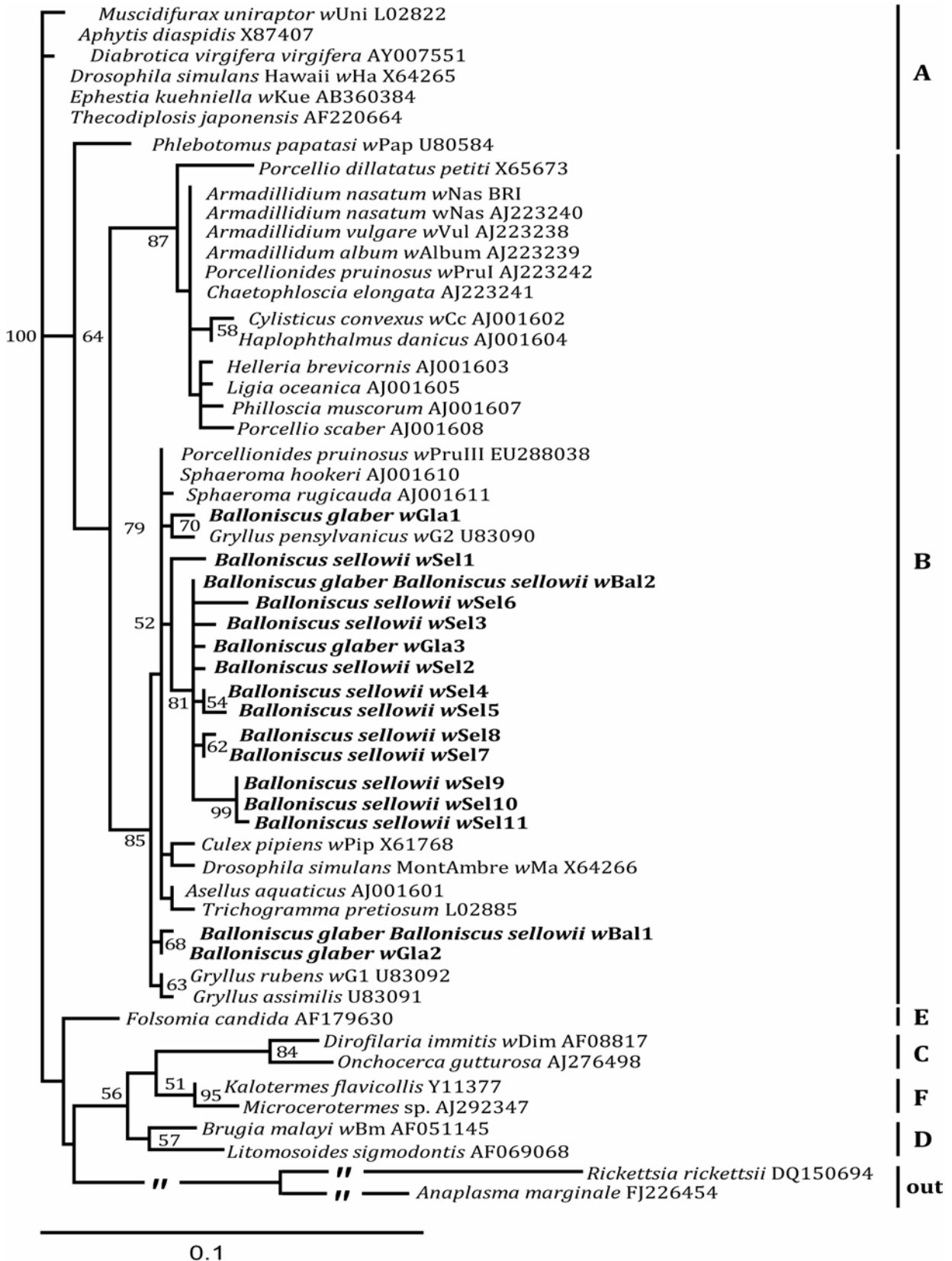


Figure 3. Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree obtained from portions of 16S rDNA nucleotide sequences of *Balloniscus-Wolbachia* (bold typed). The tree is rooted (*Anaplasma marginale* and *Rickettsia rickettsii*; out-outgroup) and MLbootstrap values are shown. Names the host arthropod species followed by strain name and an accession number denote the specific *Wolbachia* strain. Sidebars and letters A-G denote *Wolbachia* Supergroups. GeneBank accession numbers of *Wolbachia* strains: (accession numbers)

Table 1. List of populations sampled, map codes and GenBank accession numbers

Population	Map code	Geographical coordinates	Accession number
Cassino (CAS)	12	S32°10'14.8'' WO 52°10'21.4''	Accession number
Colônia Z3 (CZ3)	10	S31°40'54.2'' WO 51°52'01.7''	Accession number
Barra do Ribeiro (BRI)	7	S30°39'19.3'' WO 51°23'13.1''	Accession number
Tavares (TAV)	5	S31°17'06.4'' WO 51°05'34.7''	Accession number
Morro Santana (MSA)	3	S30°01'43.3'' WO 52°46'29.8''	Accession number
Águas Belas (ABE)	2	S30°02'10.6'' WO 51°01'10.5''	Accession number
Pelotas (PEL)	11	S31°25'59.5'' WO 51°37'44.2''	Accession number
Cidreira (CID)	4	S30°08'44.5'' WO 50°19'44.4''	Accession number
Caxias do Sul (CSU)	6	S29°10'11.4'' WO 52°49'14.2''	Accession number
Tapes (TAP)	8	S30°40'16.5'' WO 52°36'07.3''	Accession number
Mostardas (MCO)	15	S28°56'24.8'' WO 49°21'37.5''	Accession number
São Lourenço do Sul (SLS)	9	S30°02'10.6'' WO 51°01'10.5''	Accession number
Palmares do Sul (PAL)	13	S30°15'50.8'' WO 50°30'29.0''	Accession number
Glorinha (GLO)	14	S29°54'58.4'' WO 50°49'15.1''	Accession number
Porto Alegre (POA)	1	S30°01'43.3'' WO 52°46'19.8''	Accession number

Table 2. Prevalence of *Wolbachia* strains in *B. glaber* and *B. sellowii* populations

Locality	<i>B. sellowii</i>					<i>B. glaber</i>				
	N (F/M)	Strain	IF	IM	II	N (F/M)	Strain	IF	IM	II
ABE	7/12	Uninfected	0	0	0	26/21	Uninfected	0	0	0
BRI	20/6	wSel1	3	2	5	13/8	wGla1	11	4	15
CAS	11/5	wSel2	1	0	1	18/12	wGla1	11	4	16
CID	13/11	wSel7	4	1	5	26/6	wGla3	24	4	28
CSU	8/5	Uninfected	0	0	0	-	-	-	-	-
CZ3	25/13	wBal2 wSel6	4*	1*	5*	15/17	wGla1	12	8	20
GLO	11/5	wSel3 wSel7	2*	0*	2*	-	-	-	-	-
MOS	-	-	-	-	-	10/5	wGla2	2	2	4
MSA	-	-	-	-	-	33/11	wBal2	5	0	5
PAL	14/8	Uninfected	0	0	0	-	-	-	-	-
PEL	11/5	Uninfected	0	0	0	6/5	Uninfected	0	0	0
POA	20/4	wSel4 wSel5	8*	1*	9*	-	-	-	-	-
SLS	13/6	wSel8 wSel9	8*	2*	10*	-	-	-	-	-
TAP	12/6	wSel9 wSel10 wSel11	0*	4*	4*	-	-	-	-	-
TAV	10/4	wBal1	0	1	1	13/9	wBal1	7	0	7
Total	175/90		30	12	42	160/94		77	22	99

N= Number of tested individuals (Females;Males); IF: Number of infected females; IM: Number of infected males; II: Number of infected individuals. *: Overall prevalence -: Species not found

CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO GERAL

Classicamente, as relações filogenéticas dentro do grupo dos isópodos terrestres têm sido investigadas baseadas em caracteres anatômicos e morfológicos (Schmalzfuss, 1989; Wagele, 1989; Leistkow, 2001; Schmidt, 2002). Entretanto, nas últimas décadas tais relações têm sido abordadas do ponto de vista molecular com a utilização de marcadores enzimáticos (Beck e Price, 1981; Garthwaite *et al.*, 1995; Cobolli-Sbordoni *et al.*, 1995; Gentile e Sbordoni, 1998; Bilton *et al.*, 1999; Wang e Schreiber, 1999; Klossa-Kilia *et al.*, 2005; Medini-Bouaziz *et al.*, 2006; Montesanto *et al.*, 2007) e mitocondriais (Marcadé *et al.*, 1999; Rigaud *et al.*, 1999; Michel-Salzat e Bouchon, 2000; Mattern e Schlegel, 2001; Wetzer *et al.*, 2001; Rivera *et al.*, 2002; Wetzer, 2002; Charfi-Cheikrouha, 2003; Mattern, 2003; Taiti *et al.*, 2003; Klossa-Kilia *et al.*, 2006; Parmekelis *et al.*, 2008; Poulakakis e Sfenthourakis, 2008). A partir desses estudos, muitas incongruências têm sido encontradas entre as filogenias clássicas e moleculares e sugerida a reavaliação do *status* taxonômico de populações e espécies. Além disso, muitos desses estudos apontam para uma alta estruturação das populações de isópodos terrestres e os autores apontam para fatores como baixa capacidade dispersiva dos indivíduos, influência de eventos biogeográficos e/ou especiação ecológica, que poderiam explicar tal estruturação.

Em nosso estudo, ambas as análises filogenéticas baseadas no gene COI (Maxima verossimilhança e Análise bayesiana), indicaram relações complexas entre as populações das duas espécies de *Balloniscus* ao longo da Planície Costeira do Rio Grande do Sul. A partir dessas análises, quatro clados foram evidenciados (três compostos por populações de *B. sellowii* e outro clado composto por todas as populações de *B. glaber*), os quais podem estar associados à história geológica de formação da Planície Costeira no Sul do Brasil. As análises sustentam esta hipótese através de evidências de ocorrência de eventos biogeográficos comuns que afetaram ambas espécies. Por exemplo, a localização dos haplótipos de ABE (basal no clado IV e grupo irmão clado I) e compartilhamento de haplótipos entre PEL, CZ3 e CAS em ambas

espécies. Além disso, nossas análises sugerem que o fenômeno de dispersão passiva, comumente observada em espécies sinantrópicas de isópodos terrestres (Garthwaite *et al.*, 1995; Jass e Klausmeier, 2000), possa estar associado a agrupamentos de populações de *B. sellowii* distantes em um mesmo clado. Apesar de não existirem estudos ecológicos mais detalhados sobre *B. sellowii*, em campo observa-se que essa espécie está associada não somente a ambientes nativos, mas principalmente a ambientes sinantrópicos e monoculturas, especialmente de *Eucalyptus sp.* Dessa forma, *B. sellowii* associa-se a ambientes impactados pelo homem e, pode assim ser disperso passivamente.

Nosso estudo evidenciou valores de diversidade haplotípica e nucleotídica muito variáveis entre as populações de ambas espécies, com vários haplótipos específicos. Com relação à estruturação, globalmente as populações apresentaram-se homogêneas, ou seja, sem uma forte estruturação. Entretanto, comparando-se as duas espécies, as populações de *B. sellowii* apresentaram baixos valores de Φ_{ST} e altos valores de diversidade genética, indicando uma maior estruturação em relação às populações de *B. glaber*. Embora as diversidades haplotípica e nucleotídica observadas possam ser explicadas por fatores demográficos, microorganismos cotransmitidos como *Wolbachia* podem influenciar a estruturação do mtDNA através do desequilíbrio de ligação gerado pelo efeito de “carona” (*hitchhiking*) (Hurst & Jiggins, 2005) Como citado no capítulo introdutório, *Wolbachia* consiste de um grupo de endossimbiontes que infecta muitos grupos de artrópodos, sendo que isópodos terrestres estão entre os mais infectados (Bouchon *et al.*, 2008). Como visto no Capítulo 3, foi observada a presença de *Wolbachia* nas populações de ambas espécies de *Balloniscus* estudadas.

Uma das idéias surgidas a partir da presença de *Wolbachia* nas populações estudadas, seria analisar o impacto da mesma sobre a estruturação do mtDNA. Todavia, os primeiros indícios não foram muito claros. Ambos os testes de neutralidade aplicados (Tajima e Fu) são utilizados para detectar o efeito de “carona” (*hitchhinking*), embora o teste de Fu seja mais robusto nesse caso. O nosso estudo evidenciou somente três populações (*B. glaber* - CAS; *B.*

sellowii - CID e CZ3) para as quais um dos testes foi significativo. Dessas populações, talvez em CAS a falta de diversidade mitocondrial possa ser explicada pela presença da bactéria. Inicialmente, quando *Wolbachia* invade uma população, esta pode desviar a frequência de haplótipos na direção do haplótipo associado à infecção através de um balanço seletivo. Dependendo de fatores como transmissão vertical, por exemplo, em pouco tempo, esse haplótipo pode se tornar majoritário na população. Independentemente do tamanho amostral na população CAS (n= 6), todos os indivíduos infectados possuem o haplótipo H2, sendo o único indivíduo não infectado associado ao haplótipo H1. Além disso, a confirmação de que a seleção está atuando sobre um determinado simbiote pode ser analisada através da comparação da diversidade haplotípica entre indivíduos infectados e não infectados em uma mesma população ou em espécies diferentes. Geralmente, espera-se que a diversidade haplotípica seja maior em indivíduos não infectados (Dean *et al.*, 2003; Jiggins, 2003). Tanto em *B. glaber* quanto em *B. sellowii*, não foram detectadas diferenças significativas entre a diversidade haplotípica entre os indivíduos infectados e não infectados. Atualmente, os trabalhos que investigam o impacto de *Wolbachia* sobre mtDNA, utilizam marcadores nucleares como por exemplo, microssatélites para uma melhor resolução desse fenômeno (Verne *et al.*, em preparação). Inicialmente, o presente trabalho incluía os microssatélites como marcadores nucleares, mas questões técnicas impossibilitaram a continuação desse estudo.

Embora a hipótese de que os indivíduos de cada um dos grupos considerados (clados) compartilhassem um ancestral comum mais recente em relação a qualquer de um outro grupo (monofilia recíproca das duas espécies) não tenha sido rejeitada (teste de Shimodaira-Hasegawa), todos os resultados descritos até então sugerem que 1) *B. glaber* representa uma parte da variação genética contida no “complexo” formado pelos clados em *B. sellowii*; 2) *B. glaber* é uma espécie mais recente. Dessa forma, pode-se imaginar que, em algum momento ocorreu diferenciação de populações de *B. sellowii*, originando *B. glaber* e a distribuição de ambas espécies pode corroborar essa hipótese. Enquanto *B. sellowii* está distribuída ao longo de

uma ampla área geográfica (desde o sudeste do Brasil até a região central da Argentina), *B. glaber* consiste em uma espécie endêmica da Planície Costeira do Rio Grande do Sul. Com o surgimento da Planície Costeira, e, conseqüentemente novos nichos ecológicos, populações de *B. sellowii* poderiam ter ocupado essa região, diferenciando-se das populações originais a partir de processos evolutivos, como por exemplo, especiação ecológica.

De todas as populações analisadas, SLS (*B. sellowii*) foi, sem dúvida aquela que apresentou os índices mais discrepantes. Os haplótipos apresentaram altos índices de divergência intra e inter populacionais. Possíveis explicações consistem em: 1) SLS seria uma região que representa algum tipo de refúgio onde essa alta variação genética foi mantida; 2) Os indivíduos desta população seriam representantes de uma nova espécie; 3) Em SLS, a prevalência de *Wolbachia* é a mais alta entre as observadas em *B. sellowii*, com, pelo menos, duas linhagens presentes (Capítulo 3) No caso de múltiplas infecções por linhagens de *Wolbachia*, alguns estudos mostraram que diferentes linhagens estão associadas com diferentes haplótipos, introduzindo assim artefatos nas filogenias baseadas em genes mitocondriais (Hurst & Jiggins, 2005). Todas as hipóteses não são excludentes e uma melhor amostragem desta região deve ser realizada para um melhor entendimento dessa questão.

Em relação ao *status* taxonômico das duas espécies, nosso estudo corrobora a descrição de Araujo e Zardo (1995), na qual os autores descreveram *B. glaber* como uma nova espécie. Além das características morfológicas que diferenciam *B. sellowii* e *B. glaber*, evidências ecológicas tem sido observadas em campo e em laboratório. Em campo, apesar da existência de populações sintópicas, os indivíduos de *B. glaber* são geralmente encontrados enterrados no substrato, enquanto *B. sellowii* os indivíduos parecem ocupar camadas mais superficiais do substrato (junto à serrapilheira), além de serem encontrados em cascas de árvores, restos de construção e fezes secas de vacas. Além disso, ambas as espécies apresentam estratégias reprodutivas antagônicas como consequência dessa especialização em diferentes habitats (Quadros *et al.*, 2008a).

A identificação da presença/ausência de *Wolbachia* no hospedeiro é tradicionalmente feita, dentre outros métodos através de amplificação de gene(s) de interesse(s) ou parte deste(s) via PCR. Como visto no capítulo introdutório, os genes tradicionalmente utilizados para esta finalidade (*groE*, *ftsZ*, *wsp* e 16S rDNA) possuem características próprias e tais características podem se constituir em fatores decisivos não somente na detecção de *Wolbachia*, mas também na detecção de possíveis polimorfismos. No presente trabalho todos os genes citados acima (mais o gene *dnaA*) foram testados, sendo o 16S rDNA aquele que apresentou melhor resposta na detecção de *Wolbachia* em ambas espécies estudadas (*Balloniscus glaber* e *B. sellowii*). Além disso, apesar de ser um gene considerado menos polimórfico em relação aos outros (p.ex. *wsp*), foi possível a identificação de um alto polimorfismo, principalmente em populações de *B. sellowii* com o reconhecimento de 14 linhagens.

Dentre os inúmeros dados inéditos levantados no presente trabalho, sem dúvida a alta diversidade de linhagens encontrada nas espécies estudadas está entre os mais relevantes. No total foram encontradas três e 11 linhagens exclusivas, respectivamente em *B. glaber* e *B. sellowii*, sendo duas delas compartilhadas por ambas as espécies. Até o presente momento, a maior diversidade de linhagens de *Wolbachia* foi descrita para *Culex pipiens* na qual mais de 66 linhagens foram identificadas em populações do Sul da Europa e Norte da África. Em uma só população os autores constataram a presença de mais de dez linhagens (Duron *et al.*, 2006). Em isópodos, o número máximo de linhagens encontradas até o momento, restringia-se a três linhagens presentes em *Porcellionodes pruinosus* e *Armadillidium vulgare* (Michel-Salzat *et al.*, 2001; Verne *et al.* 2007). O presente estudo evidenciou uma maior diversidade de linhagens encontradas até o momento em espécies de isópodos terrestres em uma área restrita (Planície Costeira do Rio Grande do Sul) com 16 linhagens observadas. Além disso, em populações de *B. sellowii* para as quais foram descritas duas (GLO, SLS e POA) e três linhagens de *Wolbachia* (TAP), problemas técnicos impediram uma busca mais ampla por novas linhagens. Dessa

forma, tais resultados indicam que a diversidade de linhagens pode ser ainda muito maior e estudos futuros devem elucidar essas questões.

Em relação às filogenias construídas, as análises filogenéticas realizadas com bases nas sequências 16S rDNA evidenciaram que: 1) as linhagens de *Wolbachia* encontradas nas populações de ambas espécies situam-se dentro do Supergrupo B; 2) estas linhagens situam-se fora do subclado clássico descrito para os isópodos terrestres (Oniclade em Cordaux *et al.*, 2001). O primeiro resultado não é tão surpreendente, pois já era esperado que as linhagens presentes em ambas espécies estivessem situadas no Supergrupo B. Por outro lado, a não inclusão dessas linhagens dentro do Oniclade, sugere que as linhagens ocorrentes na América do Sul não são aparentadas com aquelas presentes no Oniclade. A ocorrência de *Wolbachia* em espécies exóticas de isópodos foi preliminarmente analisada, sendo identificada em *Armadillidium nasatum* de BRI a mesma linhagem encontrada em populações francesas desta espécie (*wNas* in Bouchon *et al.*, 1998). Esta pode constituir-se em uma evidência de que as linhagens encontradas nas espécies de *Balloniscus* não foram transferidas via espécies exóticas (p. ex. *A. vulgare*, *A. nasatum*, *Porcelio scaber*, etc). Dessa forma, apresentariam um histórico evolutivo particular a partir de rotas de transmissão ainda desconhecidas. Cordaux *et al.* (2001) observaram que a linhagem *wPruIII* (presente em populações francesas de *Porcellionides pruinosus*) situou-se também fora do Oniclade, sugerindo diferentes rotas de transmissão horizontal como explicação provável. Na América do Sul, essas rotas devem ser melhor entendidas, a partir da detecção de *Wolbachia* em outros grupos taxonômicos e da utilização de uma metodologia padronizada para identificação de novas linhagens (p. ex. MLST).

Apesar de não serem conhecidas as rotas de transmissão horizontal e dos resultados conflitantes em duas análises realizadas (teste de Shimodaira-Hasegawa e Fator de Bayes), os resultados sugerem um quadro de múltiplas infecções por *Wolbachia* nas populações de ambas espécies. Todavia, a partir da rede de haplótipos construída (Capítulo 3), sugere-se uma rota de invasão e transmissão de *Wolbachia* nas duas espécies de *Balloniscus*. Para melhor

entendimento dessa possível rota de invasão, dividiu-se a rede de haplótipos em dois grandes grupos: grupo 1 composto por duas linhagens ocorrentes em *B. glaber* (*wGla1* e *wGla2*), uma linhagem presente em ambas espécies (*wBal1*) e linhagens ocorrentes em outros hospedeiros (SGB) e grupo 2 composto por uma linhagem encontrada exclusivamente em *B. glaber* (*wGla3*), outra compartilhada pelas duas espécies (*wBal2*) e por todas as outras linhagens ocorrentes em *B. sellowii*. Dessa forma, sugere-se a invasão de *Wolbachia* em populações de *B. glaber*, especialmente em CAS, CZ3, BRI, MOS e TAV espalhando-se posteriormente para outras populações de *B. glaber* (CID e MSA) e, posteriormente para as populações de *B. sellowii*. As análises moleculares indicaram que *B. glaber* possivelmente seja uma espécie derivada de *B. sellowii*. Tendo em vista que a infecção nas duas espécies estudadas ocorreu através de *B. glaber*, sugere-se a hipótese de que a infecção ocorreu posteriormente à especiação. Por outro lado, não é descartada a hipótese de que *Wolbachia* possa ser agente envolvido no processo de especiação no caso das espécies de *Balloniscus*, principalmente devido a alta prevalência da bactéria em algumas populações de *B. glaber*.

As análises filogenéticas ainda sugeriram padrões filogeográficos distintos entre as linhagens ocorrentes em *B. glaber* e *B. sellowii*. As cinco linhagens de *Wolbachia* presentes em *B. glaber* estão aparentemente associadas a diferentes populações ao longo da Planície Costeira do Rio Grande do Sul, com exceção de *wGla1* (observada em três diferentes populações). Assim *wGla1* esteve presente nas populações situadas no lado interno da Laguna dos Patos e *wBal2*, *wGla3*, *wGla2* e *wBal1* presentes em populações na porção oeste, norte, nordeste e leste da Laguna dos Patos, respectivamente. Grande parte das linhagens presentes em *B. sellowii* foi associada a diferentes populações e esta distribuição evidenciada em *B. glaber*, também pode ser inferida. Por outro lado, esta distribuição parece ser menos evidente e isso se deve principalmente as relações de parentesco mais complexas dessas linhagens. Das linhagens encontradas em SLS, *wSel8* foi mais relacionada com *wSel7* encontrada em GLO e *wSel9* foi mais relacionada às outras duas linhagens observadas em TAP (*wSel10* and *wSel11*). Além

disso, a outra linhagem observada em GLO (*w*Sel3) foi mais relacionada com a única linhagem observada em CAS (*w*Sel2). Essas relações poderiam ser explicadas pelo fenômeno da dispersão passiva descrita anteriormente, através do qual a diversidade de linhagens de *Wolbachia* em uma população residente seria aumentada com a introdução de indivíduos infectados com linhagem(s) não existente(s) nessa população.

Em quatro populações infectadas (CAS, TAV, CZ3, CID e BRI) as espécies foram encontradas em sintopia. Nessas populações, esperavam-se encontrar ambas espécies infectadas com a mesma linhagem de *Wolbachia*. Todavia, esse compartilhamento ocorreu somente em TAV, onde a linhagem *w*Bal1 foi observada em ambas espécies. Considerando que esta linhagem é estreitamente aparentada com *w*Gla2, e, pelo fato desta ter sido observada exclusivamente em *B. glaber* e em uma população vizinha (MOS), sugere-se que em TAV a infecção ocorreu de *B. glaber* para *B. sellowii*. Apesar não ter sido evidenciada experimentalmente, são várias as evidências sobre a existência de transmissão horizontal de *Wolbachia* e várias hipóteses foram levantadas (Werren *et al.*, 1995a; Vavre *et al.*, 1999; Cordaux *et al.*, 2001). Dentre as hipóteses sugeridas, o contato entre indivíduos infectados (mortos ou feridos) com indivíduos não infectados via hemolinfa (Rigaud e Juchault. 1995), a divisão de um mesmo recurso alimentar (Huigens *et al.*, 2000) ou a transmissão através de um mesmo parasitóide (Heath *et al.*, 1999) são prováveis explicações para o caso de TAV. Além destas, o canibalismo (registrado em algumas espécies) poderia ser uma via de aquisição da bactéria (Paris, 1963). Além disso, de uma forma geral duas linhagens (*w*Bal1 e *w*Bal2) infectaram ambas espécies em uma mesma população (TAV) ou em populações diferentes (MSA and CZ3) e duas ou mais linhagens presentes em ambas espécies foram observadas na mesma população em quatro ocasiões (BRI. CAS. CID and CZ3). Apesar das inúmeras hipóteses que poderiam ser levantadas para explicar estes resultados, o conhecimento das rotas de transmissão horizontal é necessário para um melhor entendimento desta questão.

Em relação à prevalência de *Wolbachia* nas populações de *B. glaber* e *B. sellowii*, nossos resultados mostraram que: 1) Globalmente, em *B. glaber* a prevalência foi mais alta que em *B. sellowii* 2) Não houve diferença significativa entre a incidência de *Wolbachia* em *B. glaber* e *B. sellowii*; 3) Foi observada ausência de *Wolbachia* em duas populações de *B. glaber* e em quatro de *B. sellowii*; 4) Em *B. glaber*, fêmeas foram mais infectadas que machos, enquanto que em *B. sellowii* ambos os sexos foram igualmente infectados. Em relação ao primeiro resultado, duas linhagens (*wGla1* e *wGla3*) contribuem de forma significativa para a alta prevalência da bactéria em *B. glaber*, apresentando valores iguais ou acima de 60%. Por outro lado, as prevalências observadas em populações de *B. sellowii* não ultrapassam os 53%. Apesar dessa diferença, ambas espécies parecem ser igualmente suscetíveis à infecção. Vários são os fatores que podem explicar a prevalência de *Wolbachia* em populações naturais como, por exemplo, a existência de um sistema controlador da transmissão vertical, diferenças na ancestralidade da invasão de uma população, competição entre linhagens dentro de uma população, diferentes condições ambientais e a atuação de efeitos estocásticos na probabilidade de fixação de *Wolbachia* em uma população (Rigaud e Juchault, 1992; Shoemaker *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 2004; Ahrens e Shoemaker, 2005. Jansen *et al.*, 2008). O presente trabalho não investigou tais fatores e, dessa forma a discussão sobre diferenças das prevalências observadas torna-se muito especulativa. Ainda com relação à prevalência de *Wolbachia*, podem ser vários os fatores que explicam a ausência de *Wolbachia* em uma dada população e dentre estes podem ser citados: a ausência da(s) espécie(s) que transmitem *Wolbachia* para as espécies de *Balloniscus*, perda de *Wolbachia* por dinâmica de um efeito induzido em uma população (Werren e Windsor, 2000), colonização de novos ambientes por um hospedeiro infectado (Reuter *et al.*, 2005) ou pela presença de antibióticos naturais (Werren, 1997).

Embora o efeito de *Wolbachia* ainda seja desconhecido para as espécies de *Balloniscus* e todos sejam possíveis, dois efeitos induzidos já foram descritos em outras espécies de isópodos terrestres: a Feminização e a IC (Martin *et al.*, 1973; Legrand e Juchault, 1986; Juchault *et al.*,

1994; Bouchon *et al.*, 1998; Moret *et al.*, 2001). De acordo com Bouchon *et al.* (1998), a presença de indivíduos interssexuados na(s) população(s) é uma evidência da Feminização. Tanto em *B. glaber* quanto em *B. sellowii*, nunca foram encontrados tais indivíduos (observações de campo e em laboratório) (Araújo and Zardo, 1995; Almerão *et al.*, 2006; Quadros e Araújo, 2008). Diferentes efeitos induzidos podem ser observados em espécies próximas e mesmo em diferentes populações de uma mesma espécie (Jaenike, 2007). Imaginando que o efeito seja o mesmo para todas as populações de cada espécie, globalmente a frequência de fêmeas infectadas nas populações de *B. glaber* é maior que a frequência de machos infectados. Por outro lado, em *B. sellowii* as frequências para ambos os sexos são iguais. Caso as linhagens de *Wolbachia* presentes em cada espécie realmente induzam o mesmo efeito nas populações, em ambas espécies o efeito de Morte de Machos poderia ser descartado, pois machos que portam *Wolbachia* são mortos (Charlat *et al.*, 2005). No caso das linhagens presentes em *Balloniscus*, machos também estiveram infectados. Ainda em relação a machos infectados. Bouchon *et al.* (1998) hipotetizaram que em espécies de isópodos terrestres infectadas com linhagens indutoras de Feminização, a presença de machos infectados pode ser explicada pela resistência desses indivíduos a Feminização ou devido a diferentes níveis de Feminização (Rigaud *et al.*, 1999). Futuramente, essas evidências deverão ser mais bem investigadas, assim como os demais efeitos induzidos já descritos na literatura para outros grupos.

Os resultados gerados neste trabalho mostram relações de parentesco complexas entre duas espécies do gênero *Balloniscus* na Planície Costeira do Rio Grande do Sul. Como visto em estudos anteriores para outros grupos taxonômicos (Beheregaray *et al.*, 2002; Freygang *et al.*, 2004; Marinho e Freitas, 2006), a Planície Costeira constitui-se em uma área de grande potencial para estudos filogeográficos. Além disso, nessa área foram identificadas novas linhagens de *Wolbachia* presentes em ambas espécies estudadas. O presente trabalho gerou dados consistentes sobre a prevalência da bactéria em uma abordagem populacional. Tal

abordagem pertiniu a identificação de uma alta diversidade de linhagens e ambas espécies estudadas, com históricos de infecção diferentes daqueles já descritos para o grupo. Embora não tenham sido encontradas fortes evidências do impacto de *Wolbachia* na diversidade mitocondrial, esse foi um primeiro passo na tentativa de elucidar essa questão. No futuro, marcadores nucleares como os microssatélites devem ser investigados para uma melhor compreensão dessa questão. Os resultados também evidenciaram que os isópodos terrestres na América do Sul constituem-se excelentes modelos para o estudo da interação *Wolbachia*-hospedeiro, trazendo ótimas perspectivas para estudos futuros. Tendo em vista a enorme diversidade animal encontrada na América do Sul, sugere-se a investigação da presença de *Wolbachia* não somente em outras espécies de isópodos terrestres, mas também outros táxons, para uma melhor compreensão da história evolutiva dessa interação na América do Sul.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahrens ME and Shoemaker DD (2005) Evolutionary history of *Wolbachia* infections in the fire ant *Solenopsis invicta*. *BMC Evol Biol* 5: 35.
- Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Autom Contr* 19: 716-723.
- Almerão MP, Mendonça Jr MS, Quadros AF, Pedó E, Rabaiolli LGS and Araujo PB (2006) Terrestrial isopod diversity in the subtropical Neotropics: Itapuã State Park, southern Brazil. *Iheringia* 96: 473-477.
- Araujo PB (1992) Isópodos terrestres do Brasil meridional (Crustacea. Oniscidae). Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Porto Alegre. 215p.
- Araujo PB and Zardo MCL (1995) Uma nova espécie de *Balloniscus* Budde-Lund (Crustacea. Isopoda. Balloniscidae) do sul do Brasil. *Rev Bras Zool* 12: 785-790.
- Araujo PB, Buckup L and Bond-Buckup G (1996) Isópodos terrestres (Crustacea. Oniscidea) de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. *Iheringia* 81: 111-138.
- Azzouna A, Grève P and Martin G (2004) Sexual differentiation traits in functional males with female genital apertures (δ fga) in the woodlice *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda. Crustacea). *Gen Comp Endocrinol* 138: 42-49.
- Baldo L, Bordenstein S, Wernegreen JJ and Werren JH (2005) Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. *Mol Biol Evol* 23: 437-449.
- Baldo L, Bordenstein S, Wernegreen JJ and Werren JH (2006a) Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. *Mol Biol Evol* 23: 437-449.
- Baldo L, Dunning Hotopp JC, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MC, Tettelin H and Werren JH (2006b) 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 strains and discordance with MLST. *Curr Microbiol* 55: 81-87.
- Ballard JW, Hatzidakis J, Karr TL and Kreitman M (1996) Reduced variation in *Drosophila simulans* mitochondrial DNA. *Genetics* 144: 1519-1528.
- Ballard JW (2000) When one is not enough: introgression of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Mol Biol and Evol* 17, 1126-1130.

- Bandelt HJ, Macaulay V and Richards M (2000). Median Networks: Speedy Construction and Greedy Reduction. One Simulation. and Two Case Studies from Human mtDNA. *Mol Phylogenet Evol* 16: 8-28.
- Bandi C, Anderson TJ, Genchi C and Blaxter ML (1998) Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc R Soc Lond B* 265: 2407-2413.
- Bandi C, Slatko B and O’Neill SL (1999) *Wolbachia* genomes and the many faces of symbiosis. *Parasitol. Today* 15: 428-429.
- Bandi C, Trees S, Brattig N (2001) *Wolbachia* in filarial nematodes: Evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial disease. *Vet Parasitol* 98: 215-238.
- Baudry E, Bartos J, Emerson K, Whitworth T and Werren JH (2003) *Wolbachia* and genetic variability in the birdnest blowfly *Protocalliphora sialia*. *Mol Ecol* 12: 1843-1854.
- Beck ML and Price JO (1981) Genetic variation in the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*. *J Hered* 72: 15-18.
- Beheregaray LB, Sunnucks P and Briscoe DA (2002) A rapid fish radiation associated with the last sea level changes in southern Brazil: The silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proc R Soc Lond B* 269: 65-73.
- Ben Afia Hatira H, Charfi Cheikhrouha. F and Bouchon D (2008) In: Zimmer M. Charfi-Cheikhrouha F and Taiti S (eds.). Preliminary results on the infection status of terrestrial isopods in Tunisia by bacteria of *Wolbachia* genus. 1st edition. *Proc 7th Int Symp Terr Isopod Biol*. Shaker Verlag. Aachen. pp 1-13.
- Blaxter M (2007) Symbiont genes in host genomes: fragments with a future? *Cell Host and Microbe* 2: 211-213.
- Bilton DT, Goode D and Mallet J (1999) Genetic differentiation and natural hybridization between two morphological forms of the common woodlouse, *Oniscus asellus* Linnaeus 1758. *Heredity* 82: 462-469.
- Bordenstein SR and Werren JH (2000) Do *Wolbachia* influence fecundity in *Nasonia vitripennis*. *Heredity* 84: 54-62.
- Bordenstein SR, O’Hara FP and Werren JH (2001) *Wolbachia* induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. *Nature* 409: 707.
- Bordenstein S and Rosengaus RB (2005) Discovery of a novel *Wolbachia* super group in Isoptera. *Curr Microbiol* 51: 393-398
- Bouchon D, Rigaud T and Juchault P (1998) Evidence for wide-spread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc R Soc Lond B* 265: 1081-1090.

- Bouchon D, Cordaux R and Grève P (2008). Feminizing *Wolbachia* and the evolution of sex determination in isopods. In Bourtzis K and Miller T (eds) *Insect Symbiosis*. v3 CRC Press. pp 273-294.
- Boyle L, O'Neill SL, Robertson HM and Karr TL (1993) Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science* 260: 1796-1799.
- Braig HR, Guzman H, Tesh RB and O'Neill SL (1994) Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart. *Nature* 367: 453-455.
- Braig HR, Zhou W, Dobson SL and O'Neill SL (1998) Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J. Bacteriol.* 180: 2373-2378.
- Breeuwer JAJ and Werren JH (1993) Cytoplasmic incompatibility and bacterial density in *Nasonia vitripennis*. *Genetics*: 135. 565-574.
- Breeuwer JA and Jacobs G (1996) *Wolbachia*: intracellular manipulators of mite reproduction. *Exp Appl Acarol* 20: 421-434.
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM and Shostak AW (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margulis *et al.* revisited. *J Parasitol* 83: 575-583.
- 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.
- Charfi -Cheikhrouha F (2003) Genetic diversity in the mitochondrial 16S rDNA among five populations of *Armadillidium pelagicum* (Isopoda, Oniscidea). In: Sfenthourakis S, Araujo PB, Hornung E, Schmalzfuss H, Taiti S and Szlavecz, K (eds) *The Biology of Terrestrial Isopods V Crustaceana Monographs* 2. pp 365-380.
- Charlat S, Bourtzis K and Merot H (2002). *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. In: Seckbach J (ed) *Symbiosis: Mechanisms and Model Systems*. Kluwer. Academic Press. pp 621-644.
- Charlat S, Hurst GD and Mercot H (2003) Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends Genet* 19: 217-223.
- Charlat S, Hornett EA, Dyson EA, Ho PPY, Loc NT, Schilthuizen M, Davies N, Roderick GK and Hurst GDD (2005) Prevalence and penetrance variation of male killing *Wolbachia* across Indo-Pacific populations of the butterfly *Hypolimnas bolina*. *Mol Ecol* 14: 3525-3530.
- Ciociola Jr AI, Almeida RP, Zucchi RA and Stouthamer R (2001) Detecção de *Wolbachia* em uma população telítoca de *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner

- (Hymenoptera: Trichogrammatidae) via PCR com o *primer* específico *wsp*. Neotrop Entomol 30: 489-491.
- Clancy DJ and Hoffmann AA (1998) Environmental effects on cytoplasmic incompatibility and bacterial load in *Wolbachia*-infected *Drosophila simulans*. Entomol. Exp Appl 86: 13-24.
- Clark ME, Veneti Z, Bourtzis K and Karr TL (2002) The distribution and proliferation of the intracellular bacteria *Wolbachia* during spermatogenesis in *Drosophila*. Mech Dev 111: 3-15.
- Cobolli Sbordoni M, Taiti S, De Mattheis E and Ketmaier V (1995) Genetic relationships among populations of the *Oritoniscus paganus* group (Crustacea. Isopoda. Oniscidea) from Corsica and Giannutri (Tuscan Archipelago). Mem. Biospéol 22: 13-16.
- Coombs NJ, Gough AC and Primrose JN (1999) Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. Nucleic Acids Res 27: e12.
- Cônsoli FL and Katajima EW (2006) Symbiofauna associated with the reproductive system of *Cotesia flavipes* and *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera. Braconidae). Braz J morphol Sci 23: 463-470.
- Cook JM and Butcher RDJ (1999) The transmission and effects of *Wolbachia* bacteria in parasitoids. Res Popul Ecol 41: 15-28.
- Cordaux R, Michel-Salzat A and Bouchon D (2001) *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. J Evol Biol 14: 237-243.
- Cordaux R, Michel-Salzat A, Frelon-Raimond M, Rigaud T and Bouchon D (2004) Evidence for a new feminizing *Wolbachia* strain in the isopod *Armadillidium vulgare*: evolutionary implications. Heredity 93: 78-84.
- Czarnetzki AB and Tebbe CC (2004) Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in Collembola. Environ Microbiol 6: 35-44.
- Dean MD, Ballard KJ, Glass A and Ballard JW (2003) Influence of two *Wolbachia* strains on population structure of East African *Drosophila simulans*. Genetics 165: 1959-1969.
- De Bary HA (1879) Die Erscheinung der Symbiose. Vortrag. gehalten auf der Versammlung Deutscher Naturforscher und Aerzte zu Cassel. Trubner RJ. Strassburg
- Dedeine F, Vavre F, Fleury F, Loppin B, Hochberg ME and Bouletreau M (2001) Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. PNAS 98: 6247-6252.
- Dedeine F, Vavre F, Shoemaker DD and Bouletreau M (2004) Intra-individual coexistence of a *Wolbachia* strain required for host oogenesis with two strains inducing cytoplasmic incompatibility in the wasp *Asobara tabida*. Evolution 58: 2167-2174.

- Dedeine F, Bouletreau M and Vavre F (2005) *Wolbachia* requirement for oogenesis: occurrence within the genus *Asobara* (Hymenoptera. Braconidae) and evidence for intraspecific variation in *A. tabida*. *Heredity* 95: 394-400.
- Dittmar K and Whiting MF (2004). New *Wolbachia* endosymbionts from nearctic and neotropical fleas (Siphonaptera). *J Parasitol* 90: 953-957.
- 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.
- Dobson SL, Marsland EJ, Veneti Z, Bourtzis K and O'Neill SL (2002) Characterization of *Wolbachia* host cell range via the in vitro establishment of infections. *Appl Environ Microbiol* 68: 656-660.
- Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ and Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLOS Biol* 4: 699-710.
- Drummond AJ and Rambaut A (2007): BEAST: Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees. <http://evolve.zoo.ox.ac.uk/beast>.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y and Rurangirwa FR (2001) Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*. *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*. descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 2145-2165.
- Duron O, Fort P and Weill M (2006) Hypervariable prophage WO sequences describe an unexpected high number of *Wolbachia* variants in the mosquito *Culex pipiens*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 273: 495-502.
- Duron O, Bouchon D, Boutin S, Bellamy L, Zhou L, Engelstädter J and Hurst GDD (2008). The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biol* 6: 27.
- Dyer KA and Jaenike J (2004) Evolutionarily stable infection by a male-killing endosymbiont in *Drosophila innubila*: molecular evidence from the host and parasite genomes. *Genetics* 168: 1443-1455.
- Engelstadter J and Hurst GD (2007) The impact of male-killing bacteria on host evolutionary processes. *Genetics* 175: 245-254.

- Excoffier L, Smouse P and Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Excoffier L, Laval G and Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinfo Online* 1: 47-50.
- Fenn K, Conlon C, Jones M, Quail MA, Holroyd NE, Parkhill J and Blaxter M (2006) Phylogenetic relationships of the *Wolbachia* of nematodes and arthropods. *PLoS Pathog* 2: e94.
- Fenollar F, La Scola B, Inokuma H, Dumler JS, Taylor MJ, and Raoult D (2003) Culture and phenotypic characterization of a *Wolbachia pipientis* isolate. *J Clin Microbiol* 41: 5434-5441.
- Fialho RF and Stevens L (2000) Male-killing *Wolbachia* in a flour beetle. *Proc R Soc Lond B* 267: 1469-1474.
- Fine PEM (1975). Vectors and vertical transmission: An epidemiologic perspective. *Annals of the New York Academy of Sciences* 266: 173-194.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R and Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3: 294-299
- Foster J, Ganatra M, Kamal I, Ware J, Makarova K, Ivanova N, Bhattacharyya A, Kapatral V, Kumar S, Posfa J *et al* (2005) The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS Biol* 3: e121
- Freygang CC, Marinho JR and Freitas TRO (2004) New karyotypes and some considerations about the chromosomal diversification of *Ctenomys minutus* (Rodentia:Ctenomyidae) on the coastal plain of the Brazilian state of Rio Grande do Sul. *Genetica* 121: 125-132
- Garthwaite R, Lawson R and Sassaman C (1995) Population genetics of *Armadillidium vulgare* in Europe and North America. *Crustac Issues* 9: 145-199.
- Gentile G and Sbordoni V (1998) Indirect methods to estimate gene flow in cave and surface populations of *Androniscus dentiger* (Isopoda: Oniscidea). *Evolution* 52: 432-442
- Gherna RL, Werren JH, Weisburg W, Cote R, Woese CR, Mandelco L and Brenner DJ (1991) *Arsenophonus nasoniae* gen. nov.. sp. nov.. the causative agent of the Sonkiller trait in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Int J Syst Bacteriol* 41: 563-565
- Gorham CH, Fang QQ and Durden LA (2003) *Wolbachia* endosymbionts in fleas (Siphonaptera). *J Parasitol* 89: 283-289

- Gotoh T, Noda H and Hong XY (2003) *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility based on a survey of 42 spider mite species (Acari: Tetranychidae) in Japan. *Heredity* 91: 208-216
- Gotoh T, Noda H and Ito S (2007) *Cardinium* symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites. *Heredity* 98: 13-20
- Gottlieb Y, Zchori-Fein E, Werren JH and Karr TL (2002) Diploidy restoration in *Wolbachia*-infected *Muscidifurax uni-raptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). *J Invertebr Pathol* 81: 166-174
- Grandjean F, Rigaud T, Raimond R, Juchault P and Souty-Grosset C (1993) Mitochondrial DNA polymorphism and feminizing sex factors dynamics in a natural population of *Armadillidium vulgare* (Crustacea. Isopoda). *Genetica* 92: 55-60
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hariri AR, Werren JH and Wilkinson GS (1998) Distribution and reproductive effects of *Wolbachia* in stalked flies (Diptera; Diopsidae). *Heredity* 81: 254-260.
- Heddi A, Grenier AM, Khatchadourian C, Charles H and Nardon P (1999) Four intracellular genomes direct weevil biology: nuclear. mitochondrial. principal endosymbiont. and *Wolbachia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6814-6819
- Hertig M and Wolbach SB (1924) Studies on *Rickettsia*-like microorganisms in insects. *J Med Res* 44: 329-374
- Hertig M (1936) The *Rickettsia*. *Wolbachia pipientis* (gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito. *Culex pipiens*. *Parasitology* 28: 453-486
- Heukelbach J, Bonow I and Witt LH (2004) High infection rate of *Wolbachia* endobacteria in the sand flea *Tunga penetrans* from Brazil. *Acta Trop* 92: 225-230
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol J Linn Soc* 58: 247-276
- 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
- Hiroki M, Kato Y, Kamito T and Miura K (2002) Feminization of genetic males by a symbiotic bacterium in a butterfly. *Eurema hecabe* (Lepidoptera: Pieridae). *Naturwissenschaften* 89: 167-170
- Hiroki M, Tagami Y, Miura K and Kato Y (2004) Multiple infection with *Wolbachia* inducing different reproductive manipulations in the butterfly *Eurema hecabe*. *Proc R Soc Lond B* 271: 1751-1755

- Hoffmann AA and Turelli M (1988) Unidirectional incompatibility in *Drosophila simulans*: inheritance, geographic variation and fitness effects. *Genetics* 119: 435-44
- Hoffmann AA, Turelli M and Harshman LG (1990) Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Genetics* 126: 933-48
- Hoffmann AA and Turelli M (1997) Cytoplasmic incompatibility in insects. In: O'Neill SL, Hoffmann AA and Werren JH (eds) *Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction*. Oxford University Press, Oxford. pp 42-80
- Hoffmann AA, Hercus M and Dagher H (1998) Population dynamics of the *Wolbachia* infection causing cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 148: 221-31
- Hong XY, Gotoh T and Nagata T (2002) Vertical transmission of *Wolbachia* in *Tetranychus kanzawai* Kishida and *Panonychus mori* Yokoyama (Acari : Tetranychidae). *Heredity* 88: 190-196
- Hotopp JCD, Clark ME, Oliveira DC, Foster JM, Fisher P, Torres MMC, Giebel JD, Kumar N, Ishmael N, Wang S *et al* (2007) Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. *Science* 317: 1753-1756.
- Huigens ME, Almeida RP, Boons PAH, Luck RF and Stouthamer R (2004) Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps. *Proc R Soc Lond B* 271: 509-515
- Hurst GDD, Jiggins FJ, Schulenburg J, Bertrand D and West SA (1999a) Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proc R Soc Lond B* 266: 735-740
- Hurst GDD, Schulenburg J, Majerus TMO, Bertrand D and Zakharov IA (1999b) Invasion of one insect species, *Adalia bipunctata*, by two different male-killing bacteria. *Insect Mol Biol* 8: 133-139
- Hurst GD and Jiggins FM (2000) Male-killing bacteria in insects: mechanisms, incidence, and implications. *Emerg Infect Dis* 6: 329-336
- Hurst GD and Jiggins FM (2005) Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proc R Soc Lond B* 272: 1525-1534
- Ironside JE, Smith JE, Hatcher MJ, Sharpe RG, Rollinson D and Dunn AM (2003) Two species of feminizing microsporidian parasite coexist in populations of *Gammarus duebeni*. *J Evol Biol* 16: 467-473
- Jaenike J (2007) Spontaneous emergence of a new *Wolbachia* phenotype. *Evolution* 61: 2244-2252

- James AC and Ballard JW (2000) Expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* and its impact on infection frequencies and distribution of *Wolbachia pipientis*. *Evolution* 54: 1661-1672
- Jansen VAA, Turelli M and Godfray HCJ (2008) Stochastic spread of *Wolbachia*. *Proc R Soc Lond B* 275: 2769-2776
- Jass J and Klausmeier B (2000) Endemics and immigrants: North American terrestrial isopods (Isopoda, Oniscidea) north of Mexico. *Crustaceana* 73: 771-799
- 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., Randerson JP, Hurst GDD and Majerus MEN (2002) How can sex ratio distorters reach extreme prevalences? Male-killing *Wolbachia* are not suppressed and have near-perfect vertical transmission efficiency in *Acraea encedon*. *Evolution* 56: 2290-2295.
- Jiggins FM (2003) Male-killing *Wolbachia* and mitochondrial DNA: selective sweeps, hybrid introgression and parasite population dynamics. *Genetics* 164: 5-12.
- Johanowicz DL and Hoy MA (1996) *Wolbachia* in a predator-prey system: 16S ribosomal DNA analysis of two phytoseiids (Acari: Phytoseiidae) and their prey (Acari: Tetranychidae). *Annal Entomol Soc Am* 89: 435-441.
- Johnstone RA and Hurst GDD (1996) Maternally inherited male-killing microorganisms may confound interpretation of mitochondrial DNA variability. *Biol J Linnean Soc* 58: 453-470.
- Juchault P and Legrand JJ (1972) Croisements de neo-males experimentaux chez *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustace. Isopode. Oniscoide). Mise en evidence d'une heterogametie femelle. *C R Acad Sci III* 274: 1387-1389.
- Juchault P and Legrand JJ (1976) Etude génétique de l'intersexualité des mâles à ouvertures génitales femelles chez l'Oniscoide *Armadillidium vulgare* Latr.: interprétation et modalité de la transmission héréditaire. *C R Acad Sci III* 170 : 429-433.
- Juchault P, Louis C, Martin G and Noulin G (1991) Masculinization of female isopods (Crustacea) correlated with non-Mendelian inheritance of cytoplasmic viruses. *PNAS* 88, 10460-10464.
- Juchault P and Mocquard JP (1993) Transfer of a parasitic sex factor to the nuclear genome of the host: a hypothesis on the evolution of sex determining mechanisms in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr. *J Evol Biol* 6: 511-528.
- Juchault P, Rigaud T and Mocquard JP (1993) Evolution of sex determination and sex ratio variability in wild populations of *Armadillidium vulgare* (Latr.) (Crustacea, Isopoda): a case study in conflict resolution. *Acta Oecol* 14: 547-562.

- Juchault P, Frelon M, Bouchon D and Rigaud T (1994) New evidence for feminizing bacteria in terrestrial isopods : evolutionary implications. *C R Acad Sci III* 317: 225-230.
- Keller GP, Windsor DM, Saucedo JM and Werren JH (2004) Reproductive effects and geographical distributions of two *Wolbachia* strains infecting the Neotropical beetle. *Chelymorpha alternans* Boh. (Chrysomelidae. Cassidinae). *Mol Ecol.* 13(8): 2405-2420.
- Kittayapong P, Baisley KJ, Sharpe RG, Baimai V and O'Neill SL (2002) Maternal transmission efficiency of *Wolbachia* superinfections in *Aedes albopictus* populations in Thailand. *Am J Trop Med Hygiene* 66: 103-107.
- Klasson L, Kambris Z, Cook PE, Walker T and Sinkins SP (2009) Horizontal gene transfer between *Wolbachia* and the mosquito *Aedes aegypti* *BMC Genomics.* 10: 33.
- Klossa-Kilia E, Kiliass G and Sfenthourakis S (2005) Increased genetic diversity in Greek populations of the genus *Ligidium* (Crustacea: Isopoda: Oniscidea) revealed by RFLP analysis of mtDNA segments. *Contr Zool* 74: 255-264.
- Klossa-Kilia E, Kiliass G, Tryfonopoulos G, Koukou K, Sfenthourakis S and Parmakelis A (2006) Molecular phylogeny of the Greek populations of the genus *Ligidium* (Isopoda. Oniscidae) using three mtDNA gene segments. *Zool Scr* 35: 459-472.
- Knowles LL (2001) Did the Pleistocene glaciations promote divergence? Tests of explicit refugial models in montane grasshoppers. *Mol Ecol* 10: 691-701.
- Kondo N, Nikoh N, Ijichi N, Shimada M and Fukatsu T (2002) Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14280-14285.
- Lachaise D, Harry M, Solignac M, Lemeunier F, Benassi V and Cariou ML (2000) Evolutionary novelties in islands: *Drosophila santomea*. a new *melanogaster* sister species from São Tomé. *Proc R Soc Lond B* 267: 1487-1495.
- Legrand JJ and Juchault P (1984) Nouvelles données sur le déterminisme génétique et épigénétique de la monogénie chez le crustacé isopode terrestre *Armadillidium vulgare* Latr. *Gén Sél Evol* 16: 57-84.
- Legrand JJ and Juchault P (1986) Rôle des bactéries symbiotiques dans l'intersexualité. la monogénie et la spéciation chez des crustacés oniscoides. *Boll Zool* 53: 161-172.
- Leistikow A (2001) Phylogeny and biogeography of South American Crinocheta, traditionally placed in the family 'Philosciidae' (Crustacea: Isopoda: Oniscidea). *Organisms Diversity and Evolution* 4: 1-85.
- Lemos de Castro A (1976) Considerações sobre a sinonímia e a distribuição geográfica de *Balloniscus sellowii* (Brandt.1833) (Isopoda. Balloniscidae). *Revta Bras Biol* 36: 392-391.

- Li Z, Lin H and Guo X (2007) Prevalence of *Wolbachia* Infection in *Bemisia tabaci*. *Curr Microbiol.* 54: 467-471.
- Lo N, Casiraghi M, Salati E, Bazzocchi C and Bandi C (2002). How many *Wolbachia* supergroups exist? *Mol Biol Evol* 19: 341-346.
- Lo N and Evans TA (2007) Phylogenetic diversity of the intracellular symbiont *Wolbachia* in termites. *Mol Phylogenet Evol* 44:461-466.
- Lo N, Paraskevopoulos C, Bourtzis K, O'Neill S L, Werren JH, Bordenstein SR and Bandi C (2007) Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 654-657.
- Lombardo BM, Viglianisi F and Caruso D (2002) Genetic and morphological differentiation in some populations of *Armadillidium aelleni* (Crustacea. Isopoda. Oniscoidea). a cavernicolous species of Maltese archipelago. *Ital J Zool* 69: 381-384.
- Majerus MEN, von der Schulenburg JHG and Zakharov IA (2000) Multiple causes of male-killing in a single sample of the 2-spot ladybird. *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). from Moscow. *Heredity* 84: 605-609.
- Malloch G and Fenton B (2005) Super-infections of *Wolbachia* in byturid beetles and evidence for genetic transfer between A and B super-groups of *Wolbachia*. *Mol Ecol* 14: 627-637.
- Marcade I, Souty-Grosset C, Bouchon D, Rigaud T and Raimond R (1999) Mitochondrial DNA variability and *Wolbachia* infection in two sibling woodlice species. *Heredity* 83: 71-78.
- Margulis L, Esch GHW, Holmes JC, Kuris AM and Schad GA (1982). The use of ecological terms in parasitology (report of an ad hoc committee of an American Society of Parasitologists). *J Parasitol* 68: 131-133.
- Margulis L (1991) Symbiogenesis and symbiogenesis. In: Margulis L and Fester R (eds) *Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation*. MIT Press. Massachusetts. pp 1-14.
- Marinho JR and Freitas TRO (2006) Population structure of *Ctenomys minutus* (Rodentia, Ctenomyidae) on the coastal plain of Rio Grande do Sul, Brazil. *Acta Theriol* 51: 53-59.
- Marshall JL (2004) The *Allonemobius-Wolbachia* host-endosymbiont system: evidence for rapid speciation and against reproductive isolation driven by cytoplasmic incompatibility. *Evolution* 58: 2409-2425.
- Martin G, Juchault P and Legrand JJ (1973) Mise en evidence d'un microorganisme intracytoplasmique symbiote de l'Oniscoide *Armadillidium vulgare* L. dont la presence accompagne l'intersexualite ou la feminisation totale des males genetiques de la lignee theligene. *C R Acad Sci III* 276: 2313-2316.

- Masui S, Sasaki T and Ishikawa H (1997) *groE*-Homologous operon of *Wolbachia*. an intracellular symbiont of arthropods: a new approach for their phylogeny. *Zool Sci* 14: 701-706.
- Mattern D and Schlegel M (2001) Molecular evolution of the small subunit ribosomal DNA in woodlice (Crustacea, Isopoda, Oniscidea) and implications for oniscidean phylogeny. *Mol Phyl Evol* 18: 54-65.
- Mattern D (2003) New aspects in the phylogeny of the Oniscidea inferred from molecular data. In: Sfenthourakis S. Araujo PB de. Hornung E. Schmalfluss H. Taiti S and Szlavecz K (eds) *The Biology of Terrestrial Isopods 2*: 23-37.
- Maynard-Smith JM and Haigh J (1974) The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genet Res* 23: 23-35.
- Medini-Bouaziz L, Giuseppe M, Charfi-Cheikhrouha F, Caruso D and Lombardo BM (2006) Genetic and morphological analysis of Tunisian populations of *Porcellio variabilis* Lucas (Crustacea. Isopoda. Oniscidea) *Ital J Zool* 73: 173-178.
- Meinhardt H, Quadros AF and Araujo PB (2007) Growth curve of *Balloniscus glaber* Araujo & Zardo (Crustacea. Isopoda. Oniscidea) from Parque Estadual de Itapuã. Rio Grande do Sul. Brazil. *Rev Bras Zool* 24:1108-1112.
- Merçot H and Poinso D (1998) *Wolbachia* transmission in a naturally bi-infected *Drosophila simulans* strain from New Caledonia. *Entomol Exp Appl* 86: 97-103.
- Michel-Salzat A, Cordaux R and Bouchon D (2001) *Wolbachia* diversity in the *Porcellionides pruinosus* complex of species (Crustacea. Oniscidea): evidence for host-dependant patterns of infection. *Heredity* 87: 428-434.
- Miller MP (2005) Alleles in Space: computer software for the joint analysis of inter-individual spatial and genetic information. *J Hered* 96: 722-724.
- Montesanto G. Caruso D and Lombardo BM (2007) Taxonomic status of the Mediterranean terrestrial isopod. *Porcellio lamellatus* Budde-Lund. 1885 as inferred from genetic and morphological differentiation (Isopoda. Oniscidea). *Crustaceana* 80: 917-938.
- Morellato LPC and Haddad CFB (2000) Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* 32: 786-792.
- Moret Y, Juchault P and Rigaud T (2001) *Wolbachia* endosymbiont responsible for cytoplasmic incompatibility in a terrestrial crustacean: effects in natural and foreign hosts. *Heredity* 86: 325-332.
- Negri I, Pellicchia M, MaZZoglio PJ, Patetta A and Alma A (2006) Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta. Hemiptera), a leafhopper with an XX/X0 sex-determination system. *Proc R Soc Lond B* 273: 2409-2416.

- Nikoh N, Tanaka K, Shibata F, Kondo N, Shimada M, Hizume M and Fukatsu T. (2008) *Wolbachia* genome integrated in an insect chromosome: evolution and fate of laterally transferred endosymbiont genes. *Genome Res* 18: 272-280.
- Noda H, Miyoshi T and Zhang Q (2001) *Wolbachia* infection shared among planthoppers (Homoptera: Delphacidae) and their endoparasite (Strepsiptera: Elerchidae): a probable case of interspecies transmission. *Mol Ecol* 10: 2001-2006.
- Noda H, Miyoshi T and Koizumi Y (2002) In vitro cultivation of *Wolbachia* in insect and mammalian cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol* 38: 423-427.
- Narita S, Nomura M, Kato Y and Fukatsu T (2006) Genetic structure of sibling butterfly species affected by *Wolbachia* infection sweep: evolutionary and biogeographical implications. *Mol Ecol* 15: 1095-1108.
- O'Neill SL and Karr TL (1990) Bidirectional cytoplasmic incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature* 348: 178-180.
- O'Neill SL, Giordano R, Colbert AME, Karr TL and Robertson HM (1992) 16S rDNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *PNAS*. 94: 2699-2702.
- O'Neill SL, Hoffmann AA and Werren JH (1997) *Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction*. 1st edition. Oxford University Press. Oxford. 214 pp.
- Ono M, Braig HR, Munstermann LE, Ferro C and O'Neill SL (2001) *Wolbachia* infections of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 38: 237-241.
- Paris OH (1963) The ecology of *Armadillidium vulgare* (Isopoda: Oniscoidea) in California grassland: food, enemies, and weather. *Ecol Monograph* 33: 1-22.
- Parmakelis A, Klossa-Kilia E, Kiliadis G, Triantis KA and Sfenthourakis S (2008) Increased molecular divergence of two endemic *Trachelipus* (Isopoda, Oniscidea) species from Greece reveals patterns not congruent with current taxonomy. *Biol J Linnean Soc* 95: 362-370.
- Paraskevopoulos C, Bordenstein SR, Wernegreen JJ, Werren JH and Bourtzis K (2006) Toward a *Wolbachia* multilocus sequence typing system: discrimination of *Wolbachia* strains present in *Drosophila* species. *Curr Microbiol* 53: 388-395.
- Parecer S and Ahmadjian V (2000) *Symbiosis. An Introduction to Biological Associations*. 2nd edition. Oxford University Press. Oxford. 291 pp.
- Pijls JWAM, van Steenberg HJ and van Alphen JJM (1996) Asexuality cured: the relations and differences between sexual and asexual *Apoanagyrus diversicornis*. *Heredity* 76: 506-513.

- Plantard O, Rasplus JY, Mondor G, Le Clainche I and Solignac M (1999) Distribution and phylogeny of *Wolbachia* inducing thelytoky in Rhoditini and 'Aylacini' (Hymenoptera: Cynipidae). *Insect Mol Biol* 8: 185-191.
- Poinsot D, Bourtzis K, Markakis G, Savakis C and Mercot H (1998) *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: Host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. *Genetics* 150: 227-237.
- Posada D and Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Posada D and Buckley TR (2004). Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of the AIC and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst Biol* 53: 793-808.
- Poulakakis N and Sfenthourakis S (2008) Molecular phylogeny and phylogeography of the Greek populations of the genus *Orthometopon* (Isopoda: Oniscidea) based on mitochondrial DNA sequences. *Zool J Linnean Soc* 152: 707-715.
- Quadros AF and Araujo PB (2007) Ecological traits of two neotropical oniscideans (Crustacea: Isopoda). *Acta Zool Sinica* 53: 241-249.
- Quadros AF and Araujo PB (2008). An assemblage of terrestrial isopods (Crustacea) in southern Brazil and its contribution to leaf litter processing. *Rev Bras Zool* 25: 58-67.
- Quadros AF, Araujo PB and Sokolowicz C (2008a) In: Zimmer M, Charfi-Cheikhrouha F and Taiti S (eds.). *Reproduction of Neotropical isopods (Crustacea: Oniscidea) in southern Brazil: similarities and differences to temperate and tropical species*. 1st edition. Proc 7th Int Symp Terr Isopod Biol. Shaker Verlag, Aachen. pp 81-90.
- Quadros AF, Caubet Y and Araujo PB (2008b) Life-history of two terrestrial isopods and the dichotomy specialist-generalist. *Acta Oecol* 35: 1-7.
- Rasgon JL and Scott TW (2003) *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the California *Culex pipiens* mosquito species complex. Parameter estimates and infection dynamics in natural populations. *Genetics* 165: 2029-2038.
- Reuter M and Keller L (2003) High levels of multiple infection and recombination of *Wolbachia* in the ant *Formica exsecta*. *Mol Biol Evol* 20: 748-753.
- Reuter M, Pedersen JS and Keller L (2005) Loss of *Wolbachia* infection during colonisation in the invasive Argentine ant *Linepithema humile*. *Heredity* 94: 364-369.
- Riegler M, Charlat S, Stauffer C and Mercot H (2004) *Wolbachia* transfer from *Rhagoletis cerasi* to *Drosophila simulans*: investigating the outcomes of host-symbiont coevolution. *Appl Environ Microbiol* 70: 273-279.

- Riegler M and O'Neill SL (2006) The genus *Wolbachia*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH and Stackebrandt E (eds) *The Prokaryotes*. Springer Science. New York. pp 547-561.
- Rigaud T and Juchault P (1992) Genetic control of the vertical transmission of a cytoplasmic sex factor in *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscidea). *Heredity* 68: 47-52.
- Rigaud T and Juchault P (1993) Conflict between feminizing sex ratio distorters and an autosomal masculinizing gene in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr. *Genetics* 133: 247-252.
- Rigaud T and Juchault P (1995) Success and failure of horizontal transfers of feminizing *Wolbachia* endosymbionts in woodlice. *J Evol Biol* 8: 249-255.
- Rigaud T (1999) Further *Wolbachia* endosymbiont diversity: a tree hiding in the forest? *Trends Ecol Evol* 14: 212-213.
- Rigaud T, Bouchon D, Souty-Grosset C and Raimond R (1999) Mitochondrial DNA Polymorphism, Sex Ratio Distorters and Population Genetics in the Isopod *Armadillidium vulgare*. *Genetics* 152: 1669-1677.
- Rivera MAJ, Howarth FG, Taiti S and Roderick GK (2002) Evolution in Hawaiian cave-adapted isopods (Oniscidea: Philosciidae): vicariant speciation or adaptive shifts? *Mol. Phylogenet. Evol.* 25: 1-9.
- Rocha LS, Mascarenhas RO, Perondini ALP and Selivon D (2005) Occurrence of *Wolbachia* in Brazilian samples of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) *Neotrop Entomol* 34: 1013-1015.
- Rokas II (2000) *Wolbachia* as a speciation agent. *Trends Ecol Evol* 15: 44-45.
- Ronquist F and Huelsenbeck JP (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574
- Ross V and Hurst GDD (2009) Lateral gene transfer between prokaryotes and multicellular eukaryotes: ongoing and significant? *BMC Biol* 7:20.
- Rousset F, Bouchon D, Pintureau B, Juchault P and Solignac M (1992) *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc R Soc Lond B* 250: 91.
- Rousset F and Solignac M (1995) Evolution of single and double *Wolbachia* symbioses during speciation in the *Drosophila simulans* complex. *PNAS* 92: 6389-6393.
- Rowley SM, Raven RJ and McGraw EA (2004) *Wolbachia pipientis* in Australian spiders. *Curr Microbiol* 49: 208-214.

- Sapp J (1991) Living Together: Symbiosis and Cytoplasmic Inheritance. In: Margulis L and Fester R (eds) Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation. 1st edition. MIT Press. Cambridge . pp 15-25.
- Sasaki T and Ishikawa I (2000) Transinfection of *Wolbachia* in the mediterranean flour moth. *Ephestia kuehniella*. by embryonic microinjection. Heredity 85: 130-135.
- Selivon D, Perondini ALP, Ribeiro AF, Marino CL, Lima MMA and Coscrato VE (2002) *Wolbachia* endosymbiont in a species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera. Tephritidae). Invert Reprod Develop 42: 121-127.
- Schmalfuss H (1989) Phylogenetics in Oniscidea. Monitore Zool Ital 4: 3-27.
- Schmalfuss H (2003) World catalog of terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea). Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde. 654: 1-341.
- Schmidt C (2002) Contribution to the phylogenetic system of the Crinocheta (Crustacea, Isopoda). Part 1. (Olibrinidae to Scyphacidae s. str.). Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin, Zoologische Reihe 78: 275-352
- Schulenburg JHGVD, Hurst GDD, Huigens TME, van Meer MMM, Jiggins FM and Majerus MEN (2000). Molecular evolution and phylogenetic utility of *Wolbachia ftsZ* and *wsp* gene sequences with special reference to the origin of male-killing. Mol Biol Evol 17: 584-600.
- Shimodaira H and Hasegawa M (1999) Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. Mol Biol Evol 16: 1114-1116.
- Shoemaker DD, Katju V and Jaenike J (1999) *Wolbachia* and the Evolution of Reproductive Isolation between *Drosophila recens* and *Drosophila subquinaria*. Evolution 53: 1157-1164.
- Shoemaker DD, Ross KG, Keller L, Vargo EL and Werren JH (2000) *Wolbachia* infections in native and introduced populations of fire ants (*Solenopsis* spp.). Insect Mol Biol 9: 661-673.
- Shoemaker DD, Keller G and Ross KG (2003) Effects of *Wolbachia* on mtDNA variation in two fire ant species. Mol Ecol 12: 1757-1771.
- 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.

- Souza RF, Ramalho JDS, Morini MSC, Wolff JLC, Araújo RC and Mascara D (2009). Identification and Characterization of *Wolbachia* in *Solenopsis saevissima* Fire Ants (Hymenoptera: Formicidae) in Southeastern Brazil. *Curr Microbiol.* 58: 189-194.
- Starr MP (1975) A generalized scheme for classifying organismic associations. In: Jennings DH and Lee DL (eds). 1st edition. Symbiosis. Cambridge University Press. Cambridge. pp 1-20.
- Stouthamer R and Kazmer D (1994) Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequence for gene flow in *Trichogramma* wasps. *Heredity* 73: 317-327.
- Stouthamer R (1997) *Wolbachia*-induced parthenogenesis. In: O'Neill SL, Hoffman AA and Werren JH (eds) *Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction*. Oxford University Press. Oxford. pp 102-124.
- Suchard M, Weiss RE and Sinsheimer JS (2005) Models for estimating Bayes factors with applications to phylogeny and tests of monophyly. *Biometrics* 61: 665-673.
- Sutton S (1980) *Woodlice*. 1st edition. Pergamon Press. Oxford. 144pp.
- Swofford DL (2003) *PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*. version 4.0b10. Sinauer. Sunderland. Massachusetts. USA.
- Tagami Y, Miura K, Stouthamer R. 2001. How does infection with parthenogenesis-inducing *Wolbachia* reduce the fitness of *Trichogramma*? *Journal of Invertebrate Pathology* 78: 267-271.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Taiti S, Arnedo MA, Lew SE and Roderick GK (2003) In: Sfenthourakis S, Araújo PB, Hornung E, Schmalfuss H, Taiti S and Szlavecz K (eds). *Evolution of terrestriality in Hawaiian species of the genus Ligia (Isopoda, Oniscidea)*. *The Biology of Terrestrial Isopods* 2: 85-102.
- Taylor MJ and Hoerauf A (1999) *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. *Parasitol Today* 15: 437-442.
- Telschow A, Hammerstein P and Werren JH (2005) The effect of *Wolbachia* versus genetic incompatibilities on reinforcement and speciation. *Evolution* 59: 1607-1619.
- Telschow A, Engelstadter J, Yamamura N, Hammerstein P and Hurst GD (2006) Asymmetric gene flow and constraints on adaptation caused by sex ratio distorters. *J Evol Biol* 19: 869-878.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG (1997) The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.

- Tomazelli LJ, Dillemburg SR and Villwock JA (2000) Late quaternary geological history of Rio Grande Sul coastal plain of southern Brazil. *Rev Bras Geociências* 30: 470-472.
- Tram U and Sullivan W (2002) Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. *Science* 296: 1124-1126.
- Tram U, Ferree PM and Sullivan W (2003) Identification of *Wolbachia* host interacting factors through cytological analysis. *Microbes Infect* 5: 999-1011.
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.
- Turelli M, Hoffmann AA and McKechnie SW (1992) Dynamics of cytoplasmic incompatibility and mtDNA variation in natural *Drosophila simulans* populations. *Genetics* 132: 713-723.
- Turelli M and Hoffmann AA (1995) Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: dynamics and parameter estimates from natural populations. *Genetics* 140: 1319-38.
- Vandekerchove TMT, Watteyne S, Willems A, Swings JG, Mertens 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 wolbachial taxonomy. *FEMS Microbiol Lett* 180: 279-286.
- van Meer MMM, Witteveldt J and Stouthamer R (1999) Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. *Insect Mol Biol* 8: 399-408.
- Vavre F, Fleury F, Lepetit D, Fouillet P and Bouletreau M (1999) Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol Biol Evol* 16: 1711-1723.
- Vavre F, Fleury F, Varaldi J, Fouillet P and Bouletreau M (2000) Evidence for female mortality in *Wolbachia*-mediated cytoplasmic incompatibility in haplodiploid insects: Epidemiologic and evolutionary consequences. *Evolution* 54: 191-200.
- Vega FE, Benavides P, Stuart JA. and O'Neill SL (2002) *Wolbachia* infection in the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae). *Ann Entomol Soc Am* 95: 375-378.
- Veneti Z, Clark ME, Zabalou S, Karr TL, Savakis C and Bourtzis K (2003) Cytoplasmic incompatibility and sperm cyst infection in different *Drosophila-Wolbachia* associations. *Genetics* 164: 545-552.
- Verne S, Johnson M, Bouchon D and Grandjean F (2007) Evidence for recombination between feminizing *Wolbachia* in the isopod genus *Armadillidium*. *Gene* 397: 58-66.
- Villwock JA (1983) Geological aspects of the coastal province of RS. A synthesis. *Pesquisas* 16: 5-49.

- Villwock JA (1989) Summary of the geology of the coastal province of Rio Grande do Sul. Proc SIUEC 2: 471-484
- Villwock JA (1994) A costa brasileira: geologia e evolução. Notas Técnicas 7: 38-49.
- Wade M J (2001) Infectious speciation. Nature 409: 675-677.
- Wägele J (1989) Evolution und phylogenetische Systematik der Isopoda. Zoologica 47: 1-262.
- Wang M and Schreiber A (1999) Population genetics of the woodlouse *Porcellio scaber* Latr. (Isopoda: Oniscoidea) in central Europe: passive dispersal and postglacial range expansion. Can J Zool 77: 1337-1347.
- Warburg MR (1987) Isopods and their terrestrial environment. Adv Col Res 17: 187-242.
- Weeks AR, Marec F and Breeuwer JAJ (2001) A Mite Species That Consists Entirely of Haploid Females. Science 292: 2479-2482.
- Weeks AR, Tracy Reynolds K and Hoffmann AA (2002) *Wolbachia* dynamics and host effects: what has (and has not) been demonstrated? Trends Ecol Evol 17: 257-262.
- Weeks AR and Stouthamer R (2004) Increased fecundity associated with infection by a cytophaga-like intracellular bacterium in the predatory mite. *Metaseiulus occidentalis*. Proc R Soc Lond B 271 Suppl 4. S193-195.
- Wenseleers T, Ito F, Van Borm S, Huybrechts R, Volckaert F and Billen J (1998) Widespread occurrence of the micro-organism *Wolbachia* in ants. Proc R Soc Lond B 265: 1447-1452.
- Werren JH, Windsor DM and Guo L (1995a) Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. Proc R Soc Lond B 262: 197-204.
- Werren JH, Zhang W and Guo L (1995b) Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. Proc R Soc Lond B 261: 55-71.
- Werren JH (1997) Biology of *Wolbachia*. Annu Rev Entomol 42: 587.
- Werren JH and Windsor DM (2000) *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? Proc R Soc Lond B 267: 1277-1285.
- Werren JH and Bartos JD (2001) Recombination in *Wolbachia*. Curr Biol 11: 431-435.
- West SA, Cook JM, Werren JH and Godfray HC (1998) *Wolbachia* in two insect hostparasitoid communities. Mol Ecol 7: 1457.
- Wetzer R. (2001) Hierarchical analysis of mtDNA variation and the use of mtDNA for isopod (Crustacea: Peracarida: Isopoda) systematics. Contr Zool 70: 23-39.
- Wetzer R (2002) Mitochondrial genes and isopod phylogeny (Peracarida: Isopoda). J of Crust Biol 22: 1-14.

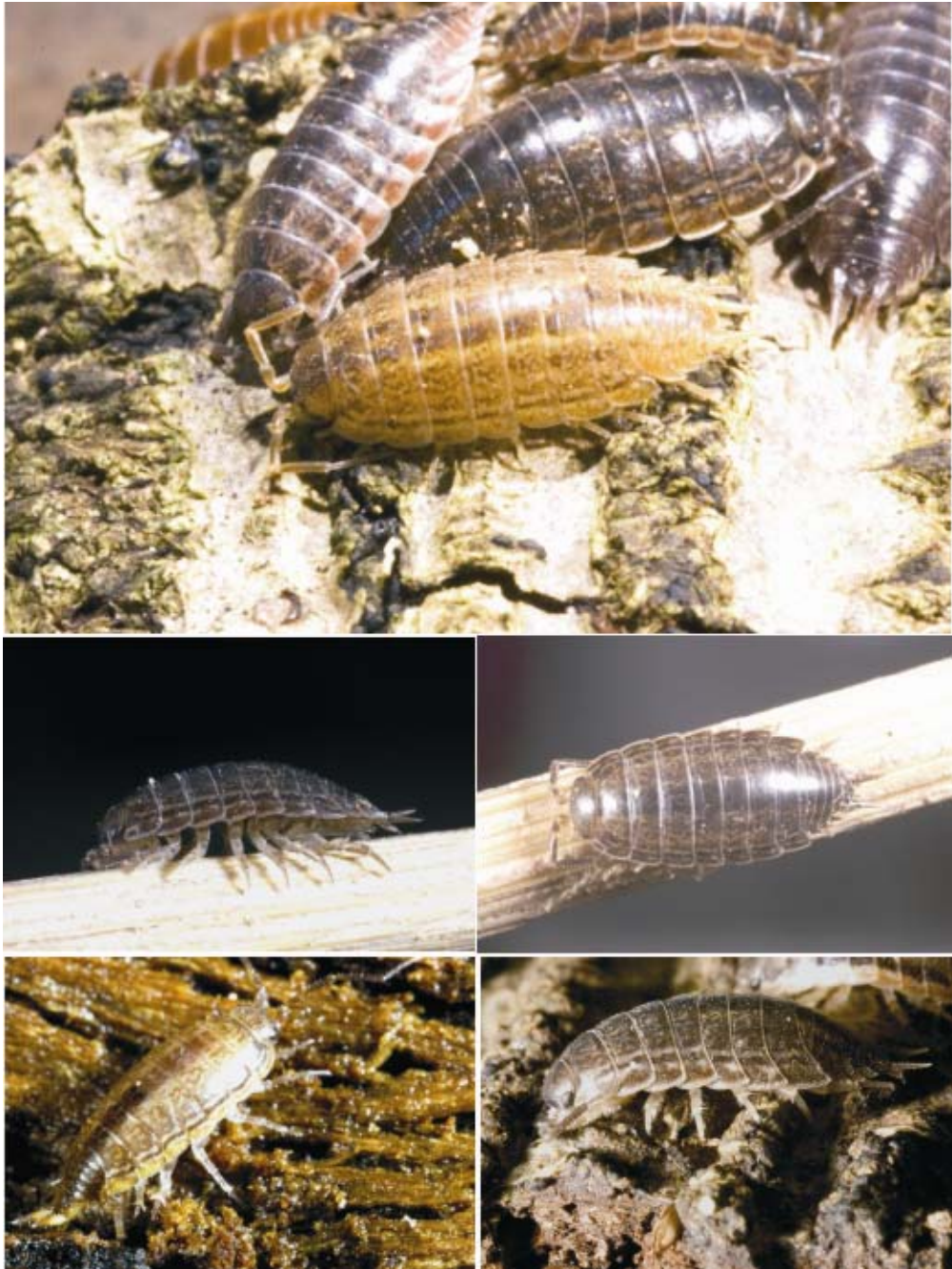
- Wiwatanaratnabutr I, Kittayapong P, Caubet Y and Bouchon D (2009) Molecular Phylogeny of *Wolbachia* Strains in Arthropod Hosts Based on groE-Homologous Gene Sequences. *Zool Sci* 26: 171-177.
- Woolfit M, Iturbe-Ormaetxe I, McGraw EA and O'Neill SL (2009) An ancient horizontal gene transfer between mosquito and the endosymbiotic bacterium *Wolbachia pipientis*. *Mol Biol Evol* 26: 367-374.
- Wu M, Sun LV, Vamathevan J, Riegler M, Deboy R, Brownlie JC, McGraw EA, Martin W, Esser C, Ahmadinejad N *et al* (2004) Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: A streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS Biol* 2: e69.
- Yamamura N and Tsuji N (1993) Parental care as a game. *J Evol Biol* 6: 103-127.
- Yen JH and Barr AR (1971) New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. *Nature* 232: 657-658.
- Zchori-Fein E, Roush RT and Hunter MS (1992) Male production by antibiotic treatment in *Encarsia formosa*. in asexual species. *Experientia* 48: 102-105.
- Zchori-Fein E, Faktor O, Zeidan M, Gottlieb Y, Czosnek H and Rosen D (1995) Parthenogenesis-inducing microorganisms in *Aphytis*. *Insect Mol. Biol* 4: 173-78.
- Zchori-Fein E and Perlman SJ (2004) Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. *Mol Ecol* 13: 2009-2016.
- Zeh DW, Zeh JA and Bonilla M (2005) *Wolbachia*. sex ratio bias and apparent male killing in the harlequin beetle riding pseudoscorpion. *Heredity* 95: 41-49.
- Zhou W, Rousset F and O'Neill SL (1998) Phylogeny and PCR based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc R Soc Lond B* 265: 509-515.

ANEXO I - Fotos *Balloniscus glaber*




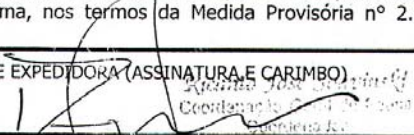
Prancha 1. *Balloniscus glaber*. Créditos: Aline Ferreira Quadros

ANEXO II - Fotos *Balloniscus sellowii*






Prancha 2. *Balloniscus sellowii*. Créditos: Luciano Valério (Lucifer)

ANEXO III - Autorização para coleta de material biológico

	INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA) DIRETORIA DE FAUNA E RECURSOS PESQUEIROS (DIFAP) COORDENAÇÃO GERAL DE FAUNA (CGFAU)		
LICENÇA PARA CAPTURA, COLETA, TRANSPORTE, EXPOSIÇÃO E FILMAGEM			
NÚMERO DA LICENÇA 027/2006 – CGFAU/LIC	Nº DE REGISTRO NO IBAMA *****	PERÍODO DE VALIDADE 23/02/2006 a 23/02/2007	PROCESSO IBAMA 02023.000034/2006
OBJETO:		FAVORECIDO:	
<input checked="" type="checkbox"/> CAPTURA E/OU COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO <input checked="" type="checkbox"/> TRANSPORTE DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO <input type="checkbox"/> COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO (PESQUISA CIENTÍFICA) <input type="checkbox"/> TRANSPORTE DE PRODUTOS E SUBPRODUTOS DA FAUNA <input type="checkbox"/> EXPOSIÇÃO E/OU CONCURSO DE ANIMAIS SILVESTRES <input type="checkbox"/> MANUTENÇÃO DE ANIMAIS EM CATIVEIRO <input type="checkbox"/> OUTROS:		<input type="checkbox"/> ZOOLOGICO <input checked="" type="checkbox"/> INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA <input checked="" type="checkbox"/> PESQUISADOR <input type="checkbox"/> EXPOSITOR/CONCURSO <input type="checkbox"/> CRIADOURO COMERCIAL <input type="checkbox"/> CRIADOURO CIENTÍFICO <input type="checkbox"/> OUTROS:	
FAVORECIDOS NOME: Aldo Mellender de Araújo, Adriano Andrejew Ferreira, André Klein, Luiz Ernesto Costa Schmidt, Maurício Pereira Almerão, Nicolás Oliveira Mega e Pedro Rates Vieira. INSTITUIÇÃO: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética. ENDEREÇO: Av. Bento Gonçalves, 9500; Prédio 43323; Sala 204 – Porto Alegre, RS, Brasil. RESPONSÁVEL PELA EXPEDIÇÃO: Aldo Mellender de Araújo .			
TRANSPORTADOR: Os pesquisadores favorecidos. MEIO DE TRANSPORTE: Fluvial / Terrestre / Aéreo PROCEDÊNCIA/LOCAL DA CAPTURA/LOCAL DA PESQUISA: Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. DESTINO: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (FZB/RS).			
LISTA DAS ESPÉCIES QUANTIDADE / TIPO	NOME CIENTÍFICO	NOME COMUM	
Capture, coleta e transporte de indivíduos (nº indeterminado)	Insecta, Arachnida e Isopoda	Lepidópteros, aracnídeos e isópodes terrestres.	
• OBSERVAÇÕES:			
1. O uso desta licença é de caráter pessoal e intransferível. 2. O responsável pela expedição deverá apresentar relatório de atividades ao término da validade desta licença e cópia das publicações resultantes dos trabalhos decorrentes do uso dos espécimes objeto desta licença. 3. Esta licença não exime o pesquisador de cumprir o disposto na Medida Provisória nº 2186-16/01 que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético. No caso de acesso ao componente do patrimônio genético, este somente se dará mediante a autorização do Ibama, nos termos da Medida Provisória nº 2.186-16/2001, Decreto nº 3.945/2001 e Decreto nº 4.946/2003.			
LOCAL E DATA DE EMISSÃO Brasília (DF), 23/02/2006	AUTORIDADE EXPEDIDORA (ASSINATURA E CARIMBO) 		
• ESTA LICENÇA NÃO AUTORIZA:			
1. CAPTURA DE ESPÉCIES QUE CONSTEM NAS LISTAS OFICIAIS (FEDERAIS, ESTADUAIS E MUNICIPAIS) DA FAUNA E FLORA BRASILEIRA AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO, ESPÉCIES ENDEMICAS/OU RARAS, OU QUE CONSTEM NO ANEXO I E II DA CONVENÇÃO SOBRE O COMÉRCIO INTERNACIONAL DE ESPÉCIES DA FAUNA E DA FLORA AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO (CITES), SALVO QUANDO ESPECIFICADO;			
2. CAPTURA, COLETA E OU TRANSPORTE DE ESPÉCIMES DA FAUNA NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE EMPREENDIMENTOS SUJEITOS AO LICENCIAMENTO AMBIENTAL, CONFORME RESOLUÇÃO DO CONAMA DE Nº 237 DE 19/12/97, SALVO QUANDO ESPECIFICADO;			
3. CAPTURA DOS ESPÉCIMES DA FAUNA EM ÁREAS DE DOMÍNIO PRIVADO, SEM O CONSENTIMENTO DO PROPRIETÁRIO, ARRENDATÁRIO, POSSEIRO OU MORADOR DA ÁREA;			
4. CAPTURA, COLETA E OU TRANSPORTE DE ESPÉCIMES FAUNA EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAIS, ESTADUAIS, DISTRITAIS OU MUNICIPAIS, SALVO QUANDO ACOMPANHADAS DO CONSENTIMENTO DO ÓRGÃO ADMINISTRADOR COMPETENTE.			
• SÃO ISENTAS DE COBRANÇA DE TAXA (RECOLHIMENTO DE DR) INSTITUIÇÕES CIENTÍFICAS, PESQUISADORES E ZOOLOGICOS PÚBLICOS.			
• VÁLIDA SOMENTE SEM EMENDAS OU RASURAS.			

ANEXO IV - Autorização para transporte de material biológico para o exterior

 MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, DOS RECURSOS HÍDRICOS E DA AMAZÔNIA LEGAL INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS		1 - LICENÇA Nº / PERMIT Nº: 07BR000237DF		Nº DE PÁGINA/PAGE Nº: 1																			
2 - VÁLIDO ATÉ / VALID UNTIL: 08/08/2007		<input type="checkbox"/> IMPORTAÇÃO <input checked="" type="checkbox"/> EXPORTAÇÃO		<input type="checkbox"/> REEXPORTAÇÃO <input type="checkbox"/> OUTROS																			
3 - EXPORTADOR / REEXPORTADOR (NOME, ENDEREÇO) / EXPORTER / RE-EXPORTER (NAME / ADDRESS) Maurício Pereira Almerão Av Bento Gonçalves n.9900 Piedra 43323 51a 215 PORTO ALEGRE - 91501-1570 malmerao@hotmail.com - 05133166732 Brasil - BR			4 - IMPORTADOR (NOME, ENDEREÇO) / IMPORTER (NAME, ADDRESS) Yves Gubet Campus Sciences, Bât. Sc. Naturelles, 1 ^{er} Etage 40 Av. Recteu Poitiers - FR-86022 05133166732 França - FR																				
5 - PAÍS DE DESTINO / COUNTRY OF DESTINATION: França - FR		6A - OBJETIVO OPERAÇÃO / PURPOSE: 8		6B - OBSERVAÇÃO / OBSERVATION: BR																			
 DIRETORIA DE ECOSSISTEMAS DEPARTAMENTO DA VIDA SILVESTRE SCEN - TRECHO 02, ED. SEDE IBAMA - CEP: 70818-900 - BRASÍLIA - DF - BRASIL LOCAL / PLACE: Brasília - DF		DATA EMISSÃO / ISSUING DATE: 08/02/2007		ASSINATURA / SIGNATURE: 																			
For live animals, this permit or certificate is only valid if the transport conditions conform to the Guidelines for Transport of Live Animals or, in the case of air transport, to the IATA Live Animals Regulations.		7 - CONDIÇÕES ESPECIAIS / SPECIAL CONDITIONS																					
<table border="1"> <thead> <tr> <th>8 - ITEM</th> <th>9 - ESPÉCIE (NOME CIENTÍFICO) / SPECIES (SCIENTIFIC NAMES)</th> <th>10 - NOME COMUM / COMMON NAME</th> <th>11 - Nº DE INSCRIÇÃO / Nº DE REGISTRO / Nº DE LICENÇA</th> <th>12 - DESCRIÇÃO / DESCRIPTION (MARKS OF NUMBERS, AGE / SEX IF LIVE)</th> <th>13 - QUANTIDADE / QUANTITY</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td><i>Baltoniscus sellowii</i></td> <td></td> <td>NC W</td> <td>ANIMAL MORTO/BODY</td> <td>500, 00</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td><i>Baltoniscus glaber</i></td> <td></td> <td>NC W</td> <td>ANIMAL MORTO/BODY</td> <td>500, 00</td> </tr> </tbody> </table> <p><i>Esta licença não autoriza o uso do material biológico para acessar informações de origem genética, contida no todo ou em parte de espécime vegetal, fúngico, microbiano ou animal, em substâncias provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, encontrados em condições in situ, inclusive domésticas, ou mantidos em coleções ex situ, desde que coletados em condições in situ, no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva, visando atividade exploratória para identificar componentes do patrimônio genético e informação sobre o conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial.</i></p> <p><i>This permit does not extend to the use of biological material to access genetic information, contained in the whole or parts of plants, fungus, microorganisms or animals specimens; in substances derived from the metabolism of these living beings or from extracts obtained from live or dead specimens, occurring in situ conditions, including domestic ones, or kept in ex situ collections, if obtained in situ conditions, in national territory, the continental shelf or the exclusive economic zone, aiming at prospecting for identification of components of the genetic patrimony and/or information about associated traditional knowledge e with potential commercial use.</i></p>						8 - ITEM	9 - ESPÉCIE (NOME CIENTÍFICO) / SPECIES (SCIENTIFIC NAMES)	10 - NOME COMUM / COMMON NAME	11 - Nº DE INSCRIÇÃO / Nº DE REGISTRO / Nº DE LICENÇA	12 - DESCRIÇÃO / DESCRIPTION (MARKS OF NUMBERS, AGE / SEX IF LIVE)	13 - QUANTIDADE / QUANTITY	1	<i>Baltoniscus sellowii</i>		NC W	ANIMAL MORTO/BODY	500, 00	2	<i>Baltoniscus glaber</i>		NC W	ANIMAL MORTO/BODY	500, 00
8 - ITEM	9 - ESPÉCIE (NOME CIENTÍFICO) / SPECIES (SCIENTIFIC NAMES)	10 - NOME COMUM / COMMON NAME	11 - Nº DE INSCRIÇÃO / Nº DE REGISTRO / Nº DE LICENÇA	12 - DESCRIÇÃO / DESCRIPTION (MARKS OF NUMBERS, AGE / SEX IF LIVE)	13 - QUANTIDADE / QUANTITY																		
1	<i>Baltoniscus sellowii</i>		NC W	ANIMAL MORTO/BODY	500, 00																		
2	<i>Baltoniscus glaber</i>		NC W	ANIMAL MORTO/BODY	500, 00																		
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">14 - RE-EXPORTATION</th> <th colspan="2">16 - OBJETIVO DA OPERAÇÃO / PURPOSE OF TRADE</th> </tr> <tr> <th>COUNTRY OF ORIGIN</th> <th>Nº PERMIT</th> <th>COUNTRY OF LAST RE-EXPORT</th> <th>CERT. Nº</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>						14 - RE-EXPORTATION		16 - OBJETIVO DA OPERAÇÃO / PURPOSE OF TRADE		COUNTRY OF ORIGIN	Nº PERMIT	COUNTRY OF LAST RE-EXPORT	CERT. Nº										
14 - RE-EXPORTATION		16 - OBJETIVO DA OPERAÇÃO / PURPOSE OF TRADE																					
COUNTRY OF ORIGIN	Nº PERMIT	COUNTRY OF LAST RE-EXPORT	CERT. Nº																				
15 - ORIGEM DOS ESPÉCIMENS / SOURCE OF SPECIMENS A - Planta reproduzida artificialmente / Artificially propagated plant B - Criação em cativeiro ou reprodução artificial / Breeding in captivity or artificial propagation C - Animal reproduzido em cativeiro / Animal bred in captivity D - Jardins Botânicos / Botanical Gardens E - Educativo / Educational F - Trófeu de caça / Hunting trophies G - Pesquisa biomédica / Bio-medical research H - In ou reintrodução ao meio silvestre / In or reintroduction into the wild I - Objeto pessoal / Personal J - Circo e exposições itinerantes / Circuses and traveling exhibitions K - Científico / Scientific L - Silvestre / Wild M - Comercial / Commercial N - Zoológico / Zoos			17 - EXPORTAÇÃO E REEXPORTAÇÃO - ENDOSSO / EXPORT AND REEXPORT ENDORSEMENT QUANTIDADE / QUANTITY:																				
18 - IMPORTAÇÃO - ENDOSSO / IMPORT ENDORSEMENT QUANTIDADE / QUANTITY:			DATA: _____ ASSINATURA / SIGNATURE: _____																				

003803

ANEXO V - Protocolos de rotina molecular

1) Extração de DNA

1.1) Protocolo Fenol-Clorofórmio (Método Wilson)

- Lavar os animais em banho de Extran 3% e depois lavar duas ou três vezes com água deslizada;

- Secar os animais com papel absorvente;

- Preparar tubos ependorfes com 5 μ L de proteinase K + 400 μ L de Tampão Wilson* (deixar sob gelo)

*Tris 100 mM

EDTA 10 mM

NaCl 100 mM

SDS 0.1 %

Dithiothreitol 50 mM

pH = 8

- Dissecar os animais (pegar de preferência ovários ou utrículos e tecido nervoso). colocando os tecidos nos tubos ;

- Macerar;

- Incubar no banho maria a 37°C por 4h;

- Adicionar ½

- Agitar lentamente;

- Centrifugar a 12000 rpm durante 8 minutos à 15°C.

- Pipetar o sobrenadante;

- Adicionar ½ volume de Fenol (200 μ L) et ½ volume de Clorofórmio isoamil (200 μ L) ;

- Agitar lentamente;

- Centrifugar à 12000 rpm durante 8 minutos a 15°C.

- Pipetar o sobrenadante;

- Adicionar 1 volume de Clorofórmio isoamil (400 μ L) ;

Centrifugar a 12000 rpm duranet 8 minutos a 15°C

- Agitar lentamente;

- Pipetar o sobrenadante;

- Adicionar 1/10 de volume (40 μ L) de Acetato de Sódio (3M-pH:7) a 1 volume isopropanol (400 μ L);

- Agitar lentamente;

- Deixar *overnight* a -20°C;

- Centrifugar a 15000 rpm durante 30 minutos a 4°C;
- Esvaziar o tubo com pipeta (em princípio o DNA estará aderido na parede do tubo);
- Adicionar 500µL de ethanol 70% (centrifugar se o *pellet* descolar se da parede do tubo)
- Adicionar 500µL de ethanol 70% (centrifugar se o *pellet* descolar se da parede do tubo)
- Esvaziar o tubo com pipeta;
- Deixar secando na capela até secar bem ;
- Adicionar 100µL de água MiliQ;
- Estocar a 4°C.

OBS: Apesar do protocolo Fenol-Clorofórmio (Método Wilson) não ter sido citado em nenhum dos trabalhos da tese. trata-se de um protocolo amplamente utilizado para extrações de DNA em isópodos terrestres. sendo utilizado nesse trabalho para testes preliminares.

1.2) Protocolo Chelex

- Em um eppendorf. colocar 100µl de resina Chelex 100[®] (Biorad) 5% (principalmente o líquido) + 5 µl proteinase K (no gelo) ;
- Colocar fragmentos dos tecidos no eppendorf;
- Macerar;
- Adicionar 20µl resina Chelex 5% (principalmente as resinas);
- Agitar levemente;
- Incubar a 56°C por no m mínimo 30 min e no máximo 1h30min;
- Incubar a 95°C - 100°C;
- Centrifugar a 12000 tr/mn durante 4 minutos (temperatura ambiene);
- Estocar a -20°C;

OBS: O protocolo Chelex foi originalmente estabelecido para extrações de DNA de materiais incluídos em resinas (Coombs *et al.*. 1999). sendo posteriormente adaptado para tecidos frescos e principalmente. para material fixado em etanol absoluto. Além disso. trata-se de um protocolo rápido e menos tóxico e poluente em relação aos protocolos que utilizam Fenol e/ou Clorofórmio.

2) Receita PCR 16S rDNA

Para um tubo (15µl)

Tampão 10x 1.5µl

MgCl₂ 1 µl

dNTP (8Mm) 0.3 µl

Primer 1 (99F) (20µM) 0.3µl

Primer 2 (994R) (20 μ M) 0.3 μ l
TaqPolrecomb (5u/ μ l) 0.1 μ l
DNA 1 μ l
H2O 10.5 μ l

Termociclador:

2' à 95°C;
1' à 95°C;
1' à 50.6°C; } 35x
1' à 72°C
5' à 72°C
15h à 15°C

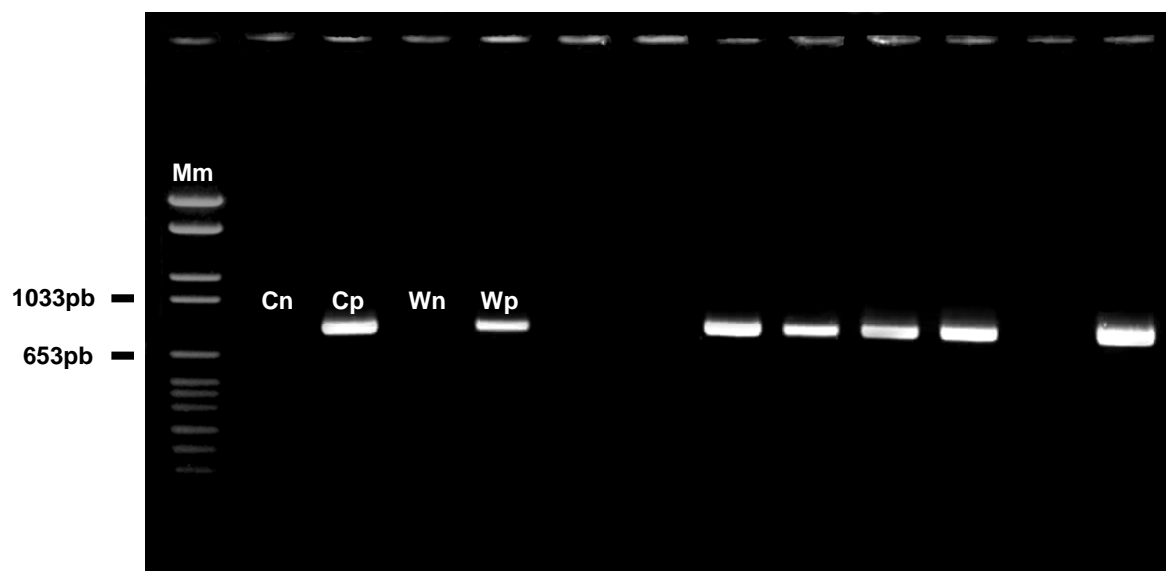


Figura 1. Foto dos produtos de PCR 16S rDNA (*Wolbachia*) amplificados e visualizados em gel de agarose 1.5%. Mm: Marcador molecular (MVI); Cn: Controle negativo; Cp: Controle positivo; Wn: *Wolbachia* negativo; Wp: *Wolbachia* positivo.

3) Receita PCR COIm

Para um tubo (15 μ l)
Tampão 10x 1.5 μ l
MgCl₂ 1 μ l
dNTP (8Mm) 0.3 μ l
Primer 1 (LCO) (20 μ M) 0.3 μ l

Primer 2 (HCO) (20 μ M) 0.3 μ l
TaqPolrecomb (5u/ μ l) 0.1 μ l
DNA 1 μ l
H₂O 10.5 μ l

Termociclador:

5' à 95°C;
50" à 95°C;
50" à 55.5°C; } 35x
1' à 72°C
5' à 72°C
15h à 15°C



Figura 2. Foto dos produtos de PCR Citocromo-oxidase I (COI) (*Balloniscus*) amplificados e visualizados em gel de agarose 1.5%. Mm: Marcador molecular (MVI); Cn: Controle negativo; Cp: Controle positivo; COIp: COI potitivo.

3) Purificação

3.1) Protocolo ExoSap

Para um tubo (7 μ l)

EXOI 0.33 μ l

SAP 0.33 μ l

H₂O MiliQ 0.34 μ l

Produto de PCR 6 μ l

Termociclador:

1h a 37°C

20' a 80°C

4) Sequenciamento

4.1) Protocolo BigDye Terminator (BDT)

Para um tubo (15 µl)

Tampão BigDye 5x 3µl

BDT 0.5µl

Primer (F ou R) (10µM) 0.32µl

H₂O 5.18µl

DNA 6µl

Termociclador:

30'' a 96°C

45'' a 96°C
30'' à 55°C
40'' à 60°C

} 25x

15h à 15°C

4.2) Protocolo Acetato de Sódio

- Para 10µl de reação

H₂O 10µl

Acetato de Na a 3M (pH=5.2) 2.2µl

Etanol 100% (temperatura ambiente) 50µl

- Homogeneizar e depois deixar precipitar durante 20 minutos (temperatura ambiente);
- Centrifugar a 14000 rpm durante 20 minutos (temperatura ambiente);
- Eliminar o sobrenadante (de preferência com a pipeta);
- Lavar com 90µl de ethanol 70% (conservado a -20°C);
- Centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos a 4°C;
- Eliminar o sobrenadante (de preferência com a pipeta);
- Deixar secar por no mínimo 30 minutos na capela até eliminar todo o etanol.
- Resuspender o *pellet* em 15µl de formamido (após essa etapa é possível conservar a -20°C);
- Deixar 30 minutos em temperatura ambiente na capela;
- Vortecar;

- Desnaturar a 95°C durante 3 minutos (Termociclador : programa DENAT);
- Colocar no gelo;
- Sequenciamento.

ANEXO VI - Alinhamento parcial do gene 16S rDNA (*Wolbachia*)

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
wGla1B.glaBRI	TAGTAGTACG	GAATAATTGT	TGGAAACAGC	AACTAATACC	GTATACGCC	TACGGGGAA	AAATTTATTG	CTATTAGATG	AGCCATATATT	GGATTAGCTA
wGla1B.glaCAS
wGla1B.glaCZ3
wGla2B.glaMOSG.....	A.....
wGla3B.glaCIDG.....GT.....	A.....
wSel6B.selCZ3G.....T.....	A.....
wSel11B.selBRIG.....T.....	A.....
wSel2B.selCASG.....T...A.....	A.....
wSel3B.selGLOG.....T.....	A.....
wSel4B.selPOAG.....T.....	A.....
wSel5B.selPOAG.....T.T.....	A.....
wSel7B.selGLOG.....TA.....	A.....
wSel7B.selCIDG.....TA.....	A.....
wSel8B.selSLSG.....TA.....	A.....
wSel9B.selSLSG.....T.....T.T.....	A.....
wSel9B.selTAPG.....T.....T.T.....	A.....
wSel10B.selTAPG.....T.....n.....T.T.....	A.....
wSel11B.selTAPG.....T.....T.T.....	A.....
wBal1B.glaB.selTAVG.....n.....T.T.....	A.....
wBal2B.glaB.selMSAG.....T.....	A.....
wBal2B.glaB.selCZ3G.....T.....	A.....
wNasBRIG.....T.....C.....	A.....T

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
wGla1B.glaBRI	GTGGGTGGAG	TAACAGCCTA	CCAAGGCAAT	GATCTATAGC	TGATCTGAGA	GGATGATCAG	CCACACTGGA	ACTGAGATAC	GGTCCAGACT	CCTACGGGAG
wGla1B.glaCAS
wGla1B.glaCZ3
wGla2B.glaMOST.....
wGla3B.glaCIDT.....
wSel6B.selCZ3T.....A.....
wSel11B.selBRIT.....T.....
wSel2B.selCAST.....
wSel3B.selGLOT.....A.....
wSel4B.selPOAT.....
wSel5B.selPOAT.....
wSel7B.selGLOT.....
wSel7B.selCIDT.....
wSel8B.selSLST.....
wSel9B.selSLST.....
wSel9B.selTAPT.....
wSel10B.selTAPT.....
wSel11B.selTAPT.....
wBal1B.glaB.selTAVT.....
wBal2B.glaB.selMSAT.....
wBal2B.glaB.selCZ3T.....
wNasBRIA.G.....T.....T.....

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
wGla1B.glaBRI	GCAGCAGTGG	GGAATATTGG	ACAATGGGCG	AAAGCCTGAT	CCAGCCATGC	CGCATGAGTG	AAGAAGGCCT	TTGGGTTGTA	AAGCTCTTTT	AGTGAGGAAG
wGla1B.glaCAS
wGla1B.glaCZ3
wGla2B.glaMOS
wGla3B.glaCID
wSel6B.selCZ3A.....
wSel11B.selBRIA.....
wSel2B.selCAS
wSel3B.selGLOG.....
wSel4B.selPOA
wSel5B.selPOAA.....
wSel7B.selGLO
wSel7B.selCID
wSel8B.selSLS
wSel9B.selSLST.....
wSel9B.selTAPT.....
wSel10B.selTAPn.....T.....
wSel11B.selTAPT.....
wBal1B.glaB.selTAV
wBal2B.glaB.selMSA
wBal2B.glaB.selCZ3
wNasBRIT.....

```

          310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
wGla1B.glaBRI  ATAATGACGG TACTCACAGA AGAAGTCTCG GCTAACTCCG TGCCAGCAGC CGCGGTAATA CGGAGAGGGC TAGCGTTATT CGGAATTATT GGGCGTAAAG
wGla1B.glaCAS  .....
wGla1B.glaCZ3  .....
wGla2B.glaMOS  .....
wGla3B.glaCID  .....
wSel6B.selCZ3  .....
wSel1B.selBRI  .....
wSel2B.selCAS  .....
wSel3B.selGLO  .....
wSel4B.selPOA  .....
wSel5B.selPOA  .....
wSel7B.selGLO  .....
wSel7B.selCID  .....
wSel8B.selSLS  .....
wSel9B.selSLS  .....
wSel9B.selTAP  .....
wSel10B.selTAP .....
wSel11B.selTAP .....
wBal1B.glaB.selTAV .....
wBal2B.glaB.selMSA .....
wBal2B.glaB.selCZ3 .....
wNasBRI        .....

```

```

          410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
wGla1B.glaBRI  GGC GCGTAGG CTGGTTAATA AGTTAAAAGT GAAATCCCGA GGCTTAACCT TGAATTGCT TTTAAAAC TAATCTAGA GATTGAAA GAATAGAGGA
wGla1B.glaCAS  .....
wGla1B.glaCZ3  .....
wGla2B.glaMOS  .....
wGla3B.glaCID  .....
wSel6B.selCZ3  .....
wSel1B.selBRI  .....
wSel2B.selCAS  .....
wSel3B.selGLO  .....
wSel4B.selPOA  .....
wSel5B.selPOA  .....
wSel7B.selGLO  .....
wSel7B.selCID  .....
wSel8B.selSLS  .....
wSel9B.selSLS  .....
wSel9B.selTAP  .....
wSel10B.selTAP .....
wSel11B.selTAP .....
wBal1B.glaB.selTAV .....
wBal2B.glaB.selMSA .....
wBal2B.glaB.selCZ3 .....
wNasBRI        .....

```

```

          510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
wGla1B.glaBRI  ATACCTGATG TAGAGGTAAA ATTCGTAAT ATTAGGAGGA ACACC-AGTG GCGAAGGCGT CTATCTGGTT CAAATCTGAC GCTGAAGCGC GAAGGCGTGG
wGla1B.glaCAS  ..T.....
wGla1B.glaCZ3  ..T.....
wGla2B.glaMOS  ..T.....
wGla3B.glaCID  ..T.....G.
wSel6B.selCZ3  ..T.....G.
wSel1B.selBRI  ..T.....A.
wSel2B.selCAS  ..T.....G.
wSel3B.selGLO  ..T.....G.
wSel4B.selPOA  ..T.....GG.
wSel5B.selPOA  ..T.....GG.
wSel7B.selGLO  ..T.....G.
wSel7B.selCID  ..T.....G.
wSel8B.selSLS  ..T.....G.
wSel9B.selSLS  ..T.....G.
wSel9B.selTAP  ..T.....G.
wSel10B.selTAP ..T.....G.
wSel11B.selTAP ..T.....G.
wBal1B.glaB.selTAV ..T.....
wBal2B.glaB.selMSA ..T.....G.
wBal2B.glaB.selCZ3 ..T.....G.
wNasBRI        ..T...AG...

```

```

          610          620          630          640
wGla1B.glaBRI  GGAGCAAACA -GGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCTGT AAC
wGla1B.glaCAS  .....
wGla1B.glaCZ3  .....
wGla2B.glaMOS  A.....
wGla3B.glaCID  .....
wSel16B.selCZ3 .....
wSel11B.selBRI .....
wSel2B.selCAS  .....
wSel3B.selGLO  .....
wSel4B.selPOA  .....
wSel5B.selPOA  .....
wSel7B.selGLO  .....
wSel7B.selCID  .....
wSel8B.selSLS  .....
wSel9B.selSLS  .....n.....
wSel9B.selTAP  .....
wSel10B.selTAP .....
wSel11B.selTAP .....
wBal1B.glaB.selTAV A.....
wBal2B.glaB.selMSA .....
wBal2B.glaB.selCZ3 .....
wNasBRI       .....

```

Figura1. Alinhamento dos fragmentos do gene 16S rDNA das linhagens de *Wolbachia* encontradas nas espécies de *Balloniscus*. amplificados pelos *primers* 99F e 994R. As 22 linhagens estão discriminadas à esquerda do alinhamento. Números acima das sequências correspondem às posições dos nucleotídeos. pontos a nucleotídeos similares e traços a *gaps* nas sequências. A letra “n” foi adicionada em posições de difícil verificação.

ANEXO VII- Alinhamento parcial do gene citocromo oxidase subunidade I (COI)

(*Balloniscus*)

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
H1	CTTTGAGTAT	AATTATTCGT	ACTGAGTTAG	GTCAATCGGG	AAGTTTGATT	GGGGATGATC	AAATCTATAA	TGTTATTGTT	ACCGCACATG	CATTGTGAAT	GATTTTTTTT
H2G.....A.....C.....T.....T.....C.....
H3G.....n.....A.....C.....T.....T.....n.....
H4G.....A.....C.....T.....T.....C.....
H5G.....A.....C.....T.....T.....C.....
H6G.....A.....C.....T.....T.....C.....
H7G.....A.....C.....T.....T.....n.....
H8G.....A.....C.....T.....T.....C.....
H9C.....C.....C.....T.....G.....
H10	.C.T.A.A.	.A.	.G.A.	.G.A.	.G.	.A.	.G.T.	.A.	.T.T.	.T.	.A.
H11n.....G.....C.....A.....C.....T.....T.....C.....
H12G.....A.....C.....T.....T.....C.....
H13g.....a.....A.....C.....T.....T.....C.....
H14	.C.T.A.A.	G.....A.G.A.	T.A.T.....C.....	.G.....C.....	.A.....A.....	.T.T.T.	.A.....
H15	.C.T.A.A.	G.....A.G.A.	T.A.T.....C.....	.G.....C.....	.A.....A.....	.T.T.T.	.A.....
H16	.C.T.A.A.G.A.	G.....A.....	.G.T.	.A.	.T.T.	.G.	.T.A.
H17	.C.T.A.A.G.A.	G.....A.....	.G.T.	.A.	.T.T.T.	.A.....
H18	.AC.A.A.A.C.....A.G.T.	T.C.A.T.....T.....G.....	.T.T.A.....
H19	.AC.A.A.A.C.....A.G.T.	T.C.A.T.....T.....G.....	.T.T.A.....
H20	.AC.A.A.A.C.....A.G.T.	T.C.A.T.....T.....G.....	.T.T.A.....
H21	.AC.A.A.A.A.G.T.	T.A.A.T.....T.....G.....	.T.T.A.....
H22	.AC.A.A.A.G.G.T.	T.C.A.T.....T.....T.....	.T.T.A.....
H23	.AC.A.A.A.A.G.T.	T.A.A.T.....T.....G.....	.T.T.C.C.	.A.....
H24	.A.A.A.A.A.G.T.	T.A.....T.....T.....	.T.T.A.....
H25	.A.A.A.A.TG.A.....G.A.	T.A.T.....G.....	.G.T.	.A.	.T.T.A.T.	.A.....
H26	.AC.A.A.A.G.T.	T.T.....T.....T.....	.T.T.A.....
H27	.AC.A.A.A.G.T.	T.T.....T.....T.....	.T.T.A.....
H28	.C.T.A.A.G.A.	G.....A.....	.G.T.	.A.	.T.T.T.	.A.....
H29	.C.T.A.A.G.A.	G.....A.....	.G.T.	.A.	.T.T.T.	.A.....
H30	.C.T.A.A.G.A.	G.....A.....	.G.T.	.A.	.T.T.T.	.A.....
H31	.C.T.A.A.G.A.	G.....A.....	.G.T.	.A.	.T.T.T.	.A.....
H32	.A.A.A.A.A.A.	.G.G.A.C	.T.C.T.....	.A.....	.T.T.T.	.A.....
H33	.A.A.A.A.A.A.	.G.GGT.....T.....	.A.....	.T.C.T.	.A.....
H34	.A.A.A.A.A.A.	.G.GG.A.T.....T.....	.A.....	.T.T.T.	.A.....
H35	.A.A.A.A.A.A.	.G.GGT.....T.....	.A.....	.T.C.T.	.A.....
H36	.A.A.A.A.A.A.	.G.GG.T.T.C.....T.....	.A.....	.T.T.T.	.A.....
H37	.A.A.A.A.A.A.	.A.T.	T.C.T.....T.....T.....	.T.T.A.....
H38	.C.A.A.A.C.....G.T.	T.A.A.T.....T.....G.....	.T.T.A.....
H39	.C.A.A.A.C.....G.T.	T.A.A.T.....T.....G.....	.T.T.A.....
H40	.A.A.A.A.C.....A.G.T.	T.C.A.T.....T.....G.....	.T.T.A.....
H41	.AC.A.A.A.A.G.T.	T.C.A.T.....T.....G.....	.T.T.A.....
H42	nnnnnnnA.C.....A.G.T.	T.C.A.T.....T.....G.....	.T.T.A.....
H43A.....G.....	.T.....G.....	.A.....A.....	T.....A.....	.T.C.G.T.....	.A.....	.A.T.....	.C.....T.....	.A.....
H44	.C.T.A.A.	G.....	T.....G.....	.A.G.A.	T.A.T.....T.....	.A.....	.A.T.....	.G.....T.....	.A.....
H45	.C.T.A.A.	G.A.....	GT.....G.....	.A.G.A.	T.A.T.....T.....	.A.....	.A.T.....	.G.....T.....	.A.....
H46	.C.C.A.A.A.G.A.T.....	.G.T.....	.A.....	.A.T.....	.C.....T.....	.A.....
H47	.C.T.A.A.G.....a.....C.....	.G.T.....	.A.....	.A.T.....T.....
H48	.C.T.A.A.n.....nn	.G.nnn.nnn	n.n.....n.....C.....	.G.T.....	.A.....	.A.T.....T.....
H50	.AC.A.A.A.A.G.T.	T.A.A.T.....T.....G.....	.T.T.C.C.....	.A.....
H51	.AC.A.A.A.A.G.T.	T.A.A.T.....T.....G.....	.T.T.C.C.....	.A.....
H52	.AC.A.A.A.A.G.T.	T.C.A.T.....T.....G.....	.T.T.A.....
H53	.AC.A.A.A.A.T.	T.C.A.T.....T.....G.....	.T.T.A.....
H54	.C.T.A.A.C.....A.....	T.A.A.CT.....T.....A.....	.T.T.T.....	.A.....
H55	.AC.A.A.A.A.T.	T.C.A.T.....T.....G.....	.T.T.A.....
H56	.AC.A.A.A.A.T.	T.C.A.T.....T.....G.....	.T.T.A.....
H57	nn.a.A.A.n.....n.....	.A.....T.....	T.C.A.T.....T.....G.....	.T.T.A.....
H58	.AC.A.A.A.A.T.	T.C.A.T.....T.....G.....	.T.T.A.....
H59	.AC.A.A.A.C.....G.G.T.	T.C.T.....T.....T.....	.T.T.C.....	.A.....
H60	.AC.A.A.A.C.....nn.G.T.	T.C.T.....T.....T.....	.T.T.A.....
H61	.C.T.A.A.A.A.	T.A.T.....T.....	.A.....	.T.....T.....	.A.....
H62	.C.T.A.A.G.A.	.G.A.	T.A.A.T.....T.....	.A.....	.T.C.T.....
H63	.C.T.A.A.C.....A.....	T.A.A.CT.....T.....	.A.....	.T.T.T.....	.A.....
H64	.A.A.A.A.G.GGT.C.....T.....	.A.C.....	.T.T.T.....	.A.....

	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
H1	TCCACCTTCT	TTGCTTCTTT	TATTAAGAAG	TGGGTTAGTT	GAGAGAGGGG	TGGGAACCTGG	TTGGACAGTT	TATCCTCCTT	TGGCTGGAAA	TATTGCTCAC	AGAGGAGGGT
H2T.....A.....GC...
H3A.....nc...n.
H4C	..A.....A.....C.T
H5T.....A.....GC...
H6A.....C...
H7A.....
H8A.....C...
H9A	..n.G...	C..G...A.....TT.
H10	A..T.....	..AT.AT.AG...	A..C..A..	..A..T..	..A..A..	..A..T..A.....C.T	..T..T..T.
H11A.....C...
H12A.....C...
H13CA.....C...
H14	A..T.....	..AT.....G.G...	..T.....	..A.T.A.	..T.....	..A..C.A.G...A.....C.T	..G..T..A.
H15	A..T.....	..AT.....G.G...	..T.....	..A.T.A.	..T.....	..A..C.A.G...A.....C.T	..G..T..A.
H16	G..T.....	..AT.AT.AG...	A..C..A..	..A..T..	..A..A..	..A..T..A.....C.T	..TA.T..T.
H17	G..T.....	..AT.AT.AC.G...	A..C..A..	..A..T..	..A..A..	..A..T..A.....C.T	..T..T..T.
H18	A.....	..AT.C...G...A.T.A.	..T.G.A.	..A..A..C...	.A.....C.G.T	..T..G..T.
H19	A.....	..AT.C...G...A.T.A.	..T.G.A.	..A..A..C...	.A.....C.G.T	..T..G..T.
H20	A.....	..AT.C...G...A.T.A.	..T.G.A.	..A..A..C...	.A.....G.G.T	..T..G..T.
H21	A.....	..AT.C...G...A.T.A.	..T.G.A.	..A..A..C...	.A.....G.T	..T..G..T.
H22	A..C.....	..AT.C...T...	..T..A..	..A.T..	..T..A..	..A..A..A.....GA.TT.
H23	A.....	..AT.C...G...A.T.A.	..T.G.A.	..A..A..C...	.A.....G.T	..T..G..T.
H24	A..T.....	..AT..C..G.T...	..T..A..	..A.T..	..T..A..	..A..A..A.....GA.T	..G..T..
H25	..T.....	..AT..T.AGCT.	A..A..A..	..A.G.T.	..A.....	..A.G...A.....G.T	..G..A..
H26	A..C.....	..AT.C..C.G...A.T..	..T..A..	..A..A..A.....GA.T	..G..T..
H27	A..T.....	..AT.C..C.G...A.T..	..T..A..	..A..A..A.....GA.T	..G..T..
H28	A..T.....	..AT..C..C.G...	A..C..A..	..A..T..	..A..A..	..A..T..A.....C.T	..T..T..T.
H29	G..T.....	..AT.AT.AC.G...	A..C..A..	..A..T..	..A..A..	..A..T..A.....C.T	..T..T..T.
H30	A..T.....	..AT.AT.AC.G...	A..C..A..	..A..T..	..A..A..	..A..T..A.....T	..T..T..T.
H31	A..T.....	..T.AT.AG...	A..C..A..	..A..T..	..A..A..	..A..T..A.....T	..T..T..T.
H32	A..T.....	..AT.AT.AG...A	..A.T.A.	..T.G.A.	..G..G...C...	.A.....C.TA.
H33	A..T.....	..AT.AT.AG...A	..A.T.A.	..T.G.A.	..G..A.G...A.....GT
H34	A..T.....	..AT.AT.AG...A	..A.T.A.	..T.G.A.	..G..A.G...C...	.A.....T
H35	A..T.....	..AT.AT.AG...A	..A.T.A.	..T.G.A.	..G..A.G...A.....GT
H36	A..T.....	..AT.AT.AG...A	..A.T.A.	..T.G.A.	..G..A.G...A.....A.T
H37	A..C.....	..AT.C...G...T	..A.T.A.	..T..A..	..A..A..C...	.A.....G..GA.T	..G..T..
H38	A..C.....	..AT.....G...A	..A.T.A.	..T.G.A.	..C..A..A.....G..G.TT.
H39	A..C.....	..AT.....G...A	..A.T.A.	..T.G.A.	..C..A..A.....G..G.TT.
H40	A.....	..AT.C...G...A.T.A.	..T.G.A.	..A..A..C...	.A.....C.G.T	..T..G..T.
H41	A.....	..AT.C...G...A.T.A.	..T.G.A.	..A..A..C...	.A.....G..T	..T..T..T.
H42	A.....	..AT.C...G...C	..A.T.A.	..T.G.A.	..A..A..C...	.A.....C.G.T	..T..G..T.
H43	A..T.....	..AT.AT.AC..T...	..T..A.C	..A.C.A.	..T..A..	..A..A..A.....C.T	..C..A..G
H44	A..T.....	..AT..T.AT...	..A..A..	..A..T..	..T..A..	..A..T..A.....AT..G	..T..T..GA.T
H45	A..T.....	..AT..T.AT...	..AA..A..	..A..T..	..T..A..	..A..T..A.....AT..G	..T..T..GA.T
H46	A.....	..AT..T.AG...	A..T.....	..A..T..	..T..A..	..A..T..AC...	.A.....AT..CT..CT.
H47	A.....	..AT..T.AG...	A..T.....	..A..T..	..A.G.A.	..A..T..AC...	.A.....G...T..T.
H48	A.....	..AT..T.AG...	A..T.....	..A..T..	..A.G.A.	..A..T..AA.....G...T..T.
H50	A.....	..AT.C...G...A	..A.T.A.	..T.G.A.	..A..A..C...	.A.....G..T	..T..G..T.
H51	A.....	..AT.C...G...A.T.A.	..T.G.A.	..A..A..C...	.A.....G..T	..T..G..T.
H52	A.....	..AT.C...G...A.T.A.	..T..A..	..A..A..C...	.A.....G..T	..T..G..T.
H53	A.....	..AT.C...G...A.T.A.	..T.C.A.	..A..A..C...	.A.....G..T	..T..G..T.
H54	A..T.....	..AT.....G...	G..T.....	..A.G.A.	..T.T.A.	..A.....A.....T	..T..T..T.
H55	A.....	..AT.C...G...A.T.A.	..T.G.A.	..A..A..C...	.A.....G..T	..T..G..T.
H56	A.....	..AT.C...G...A.T.A.	..T.G.A.	..A..A..C...	.A.....G..T	..T..G..T.
H57	A.....	..AT.C...G...A.T.A.	..T.G.A.	..A..A..C...	.A.....G..T	..T..G..T.
H58	A.....	..AT.....G...A.T.A.	..T.G.A.	..A..A..C...	.A.....G..T	..T..G..T.
H59	A..C.....	..AT.C..C.G.T...	..T..A..	..A.T..	..T..A..	..A..A..A.....GA.TT.
H60	A..C.....	..AT..C..G.T...	..T..A..	..A.T..	..T..A..	..A..A..A.....GA.T	..G..T..
H61	A..T.....	..AT.....G...	G..T.....	..A.T..	..T.G.A.	..A.....A.....T	..T..T..A.
H62	A..T.....	..AT.....G...C	..A.T..	..T.G.A.	..A.....C...	.A.....T
H63	A..T.....	..AT.....G...	G..T.....	..A.G.A.	..T.T.A.	..A.....A.....T	..T..T..T.
H64	A..T.....	..AT.AT.AG...A	..A.T.A.	..T..A..	..G..A.G...A.....A.T

	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440
H1	CTGTGGATAT	AGGTATTTTT	TCTCTTCATT	TAGCTGGGGC	GAGATCTATT	TTAGGAGCTG	TAAATTTTAT	TACAACTGTA	ATAAATATAC	GTATGAAGGG	TATAAGAATG
H2									T		
H3								n	T		
H4									T	G	
H5									T		
H6									T		
H7									T		
H8									T		
H9	A.A.	G.A.			G	G.G.			G	T	T
H10	G.T.	G.A.			C.T.	G.A.	T		GT.A.	T	
H11					T				GT	T	
H12									T		
H13									T		
H14	A.A.	A			G.A.	T			GT	T	A.A.A.
H15	A.A.	A			G.A.	T			GT	T	A.A.A.
H16	A.T.	G.A.			T.T.	G	A	T	GT.A.	T	A.A.
H17	A.T.	G.A.			C.T.	G	A	T	GT.A.	T	A.A.
H18	A.A.	A			T.A.	G.G.			GG	C	T
H19	A.A.	A			T.A.	G.G.			GG	C	T
H20	A.A.	A			T.A.	G.G.			GG	C	T
H21	A.A.	A			T.A.	G.G.			GG	C	T
H22	A.A.	A			T.A.	G.G.			GG	T	C
H23	A.A.	A			T.A.	G.G.			GG	C	T
H24	A	A			T.A.	G.G.			GG	T	
H25	A.A.				A.AAT	T			G	T	T
H26	A.A.				T.A.	G	A	T	GT	T	T
H27	A.A.				T.A.	G	A	T	GT	T	T
H28	A.T.C.	G.A.			C.T.	G	A	T	GT.A.	T	
H29	A.T.	G.A.			C.T.	G	A	T	GT.A.	T	
H30	A.T.	G.A.			C.T.	G	A	T	GT.A.	T	
H31	A.T.	G.A.			T.T.	G	A	T	GT.A.	T	
H32	A	A			G.G.T	T.C.A.			GT	T	A.A.A.
H33	A	A			G.G.T	T.T.A.			GT	G	T
H34	A	A			G.T.T	T.T.A.C			GT	T	A.A.A.
H35	A	A			G.G.T	T.C.A.			GT	G	T
H36	A	A			G.G.T	T.G.A.			GT	G	T
H37	A.A.				T.A.	G	A	T	GG	T	T
H38	A.A.				T.A.	G	A	T	G	T	A.A.A.
H39	A.A.				T.A.	G	A	T	G	T	A.A.A.
H40	A.A.				T.A.	G.G.			GG	C	T
H41	A.A.				T.A.	G.G.			GG	T	A.A.A.
H42	A.A.				T.A.	G.G.			GG	C	T
H43	A.A.				T.A.	G	A	T	GT	T	A.A.A.
H44	A	A			A.A.T	A.G			G	G	G
H45	A	A			A.A.T	A.G			C.G	GG	T
H46	A.A.				T.T	A			GC	A	A
H47	A.A.				A	A			GT	T	A.A.A.
H48	A.A.				A	A			GT	T	A.A.A.
H50	A.A.				T.A.	G.G.			GG	C	T
H51	A.A.				T.A.	G.G.			GG	C	T
H52	A.A.				T.A.	G.G.			GG	C	T
H53	A.A.				T.A.	G.G.			GG	C	T
H54	A.A.				T.A.	G	A	T	GT	T	A.A.A.
H55	A.A.				T.A.	G.G.			GG	C	T
H56	A.A.				T.A.	G.G.			GG	C	T
H57	A.A.				T.A.	G.G.			GG	C	T
H58	A.A.				T.A.	G.G.			GG	C	T
H59	A.C.	A			T.A.	G.G.			GG	T	T
H60	A.C.	A			T.A.	G.G.			GG	T	T
H61	A.A.				T.G	G.A.			GT	T	A.A.A.
H62	A.A.				T.A.	G.A.			GT	T	A.A.A.
H63	A.A.				T.A.	G.A.			GT	T	A.A.A.
H64	A.A.				T.C.A.	A			GT	G	T

	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550
H1	GATAAAGTTA	CTTTGTTCAAT	TTGGTCTGTT	TTTATTACTG	CTATTCTTCT	TTTGTTATCT	TTACCTGTTT	TAGCAGGGGC	TATTACAATA	TTGTTAACTG	ATCGTAATT
H2T..
H3T..
H4
H5T..
H6T..A..A..
H7T..A..A..
H8T..A..A..
H9A..T..C..A..G..
H10C..A..A..TG..	A.....A..C..G..A.....G..A.....
H11
H12
H13
H14G..A..A..TG..	A..A.....AA.....A..C..C..T.....A..	A.....G.....A.....A.....A.....
H15G..A..A..TG..	A..A.....AA.....A..C..C..T.....A..	A.....G.....A.....A.....A.....
H16C..A..A..TG..	A.....A.....A..C..G..G.....	A.....G.....A.....A.....A.....
H17C..A..A..TG..	A.....A.....A..C..G.....	A.....G.....A.....A.....A.....
H18C..A..TG..	A..A.....AAC..T..A..C..T.....G.....A.....A.....A.....A.....
H19C..A..TG..	A..A.....AAC..T..A..C..T.....G.....A.....A.....A.....A.....
H20C..A..TG..	A..A.....AAC..T..A..C..T.....G.....A.....A.....A.....A.....
H21C..A..TG..	A..A.....AAC..T..A..C..T.....G.....A.....A.....A.....A.....
H22A..TG..	A..A.....AAC..T..A..C..T.....T..A.....A.....A.....C.....
H23C..A..TG..	A.....AC..T..A..C..T.....G.....A.....A.....A.....A.....
H24A..TG..	A..A.....AAC..T..A..C..T.....T..G.....A.....A.....A.....C.....
H25G.....TG..	A.....AA.....A..C.....AC..	T.....T.....	A.....T.....A.....A.....A.....A.....
H26A..TG..	A..A.....AAC..T..A..C..T.....T..	A.....A.....A.....A.....C.....
H27A..TG..	A..A.....AAC..T..A..C..T.....T..	G.....A.....A.....A.....C.....
H28C..A..A..TG..	A.....A.....A..C.....G.....	A.....G.....A.....A.....A.....
H29C..A..A..TG..	A.....A.....G.....	A.....G.....A.....A.....A.....
H30C..A..A..TG..	A.....A.....A..C.....G.....	A.....G.....G.....A.....A.....
H31T..A..A..TG..	A.....A.....A..C.....G.....	A.....G.....A.....G.....C..A.....
H32G..G..A..TG..A..AAC.....G.....C..T..T..A..A.....A.....A.....A.....
H33G..G..TG..A..AAC.....G.....C..T.....A..A.....A.....A.....A.....
H34G..GG..A..TG..A..AAC.....G.....C..T..G..A..AC.....A.....A.....A.....
H35G..G..TG..A..AA.....G.....C..T..G..A..A.....A.....A.....A.....
H36G..G..G.....A..AAC.....G.....C..T..G..A..A..G..A.....A.....A.....
H37A..TG..	A..A.....AAC..T..A..C..T.....T.....C.....A.....G.....A.....C.....
H38A..TG..	A..A.....AAC..T..A..C..T.....T..A..T.....A.....A.....A.....A.....
H39A..TG..	A..A.....AAC..T..A..C..T.....T..A..T.....A.....A.....A.....A.....
H40C..A..TG..	A..A.....AAC..T..A..C..T.....G.....A.....A.....A.....A.....
H41C..A..TG..	A..A.....AAC..T..A..C..T.....T.....A.....A.....A.....A.....
H42C..A..TG..	A..A.....AAC..T..A..C..T.....G.....A.....A.....A.....A.....
H43A..TG..A..AA.....A.....	CC..T..T..A..	A.....A.....A.....A.....A.....
H44GA..T..A..T..C..A.....A.....A.....A..C.....G.....C..	T.....A.....	A.....T.....A..G..G.....G.....G.....
H45GA..T..A..T..C..A.....A.....A.....A..C.....G.....C..	T.....A.....	A.....T.....A..G..G.....G.....G.....
H46C..A..TG..	A.....A.....A.....G.....C..C..C..T..T..A.....A.....G.....
H47A..TG..	A.....A..AA.....A.....	C..T.....T.....A.....A.....A.....
H48A..TG..	A.....A..AC.....A.....A.....	C..T.....T.....A.....A.....A.....
H50C..A..TG..	A.....AC..T..A..C..T.....G.....A.....A.....A.....A.....
H51C..A..TG..	A.....AC..T..A..C..T.....G.....A.....A.....A.....A.....
H52C.....TG..	A..A.....AAC..T..A..C..T.....G.....A.....A.....A.....A.....
H53A..TG..	A..A.....AAC..T..A..C..T.....T.....A.....A.....A.....A.....
H54A.....G..A..A..AA.....C.....C..T.....A..A.....A.....A.....A.....A.....
H55A..TG..	A..A.....AAC..T..A..C..T.....T.....A.....A.....A.....A.....
H56A..TG..	A..A.....AC..AC..T..A..C..T.....T.....A.....A.....A.....A.....
H57A..TG..	A..A.....AAC..T..A..C..T.....T.....A.....A.....A.....A.....
H58A..TG..	A..A.....AAC..T..A..C..T.....T.....A.....A.....A.....A.....
H59A..TG..	A..A.....AAC..T..A..C..T.....T.....G.....A.....A.....A.....C.....
H60A..TG..	A..A.....AAC.....nnnC..T.....T.....G.....A.....A.....A.....C.....
H61G..A..A..TG..	A.....A.....A.....	C..T..G..A..	A.....A.....A.....A.....A.....
H62A..TG..	A.....A.....A.....	C..T.....A..A..C.....A.....A.....A.....A.....
H63A.....G..A..AA.....A.....	C..T.....A..A.....A.....A.....A.....A.....
H64G..G..G.....A..AAC.....A.....C..T..G..A..A.....A.....A.....A.....

```

      560      570      580      590      600      610      620
H1  AAATACTTCT TTTTTTGATC CAAGAGGAGG AGGGGATCCT ATTTTATATC AGCATTGGTT TTGATTTTTT GGTC
H2  .....
H3  .....
H4  .....
H5  .....
H6  .....
H7  .....
H8  .....
H9  .....
H10 .....
H11 .....
H12 .....
H13 .....
H14 G.....
H15 G.....
H16 .....
H17 .....
H18 .....
H19 .....
H20 .....
H21 .....
H22 T.....
H23 G.....
H24 T.....
H25 G.....
H26 T.....
H27 T.....
H28 .....
H29 .....
H30 .....
H31 .....
H32 .....
H33 .....
H34 G.....
H35 .....
H36 .....
H37 T.....
H38 .....
H39 .....
H40 .....
H41 .....
H42 .....
H43 .....
H44 G..C.....
H45 G..C.....
H46 ..C.....
H47 .....
H48 .....
H50 G.....
H51 G.....
H52 .....
H53 .....
H54 .....
H55 .....
H56 .....
H57 .....
H58 .....
H59 T.....
H60 T.....
H61 .....
H62 .....
H63 T.....
H64 .....

```

Figura 2. Alinhamento dos fragmentos do gene COI das espécies de *Balloniscus*, amplificados pelos *primers* LCO e HCO. Os 63 hapótipos estão discriminadas à esquerda do alinhamento. Números acima das sequências correspondem às posições dos nucleotídeos. pontos a nucleotídeos similares e traços a *gaps* nas sequências. A letra “n” foi adicionada em posições de difícil verificação.