

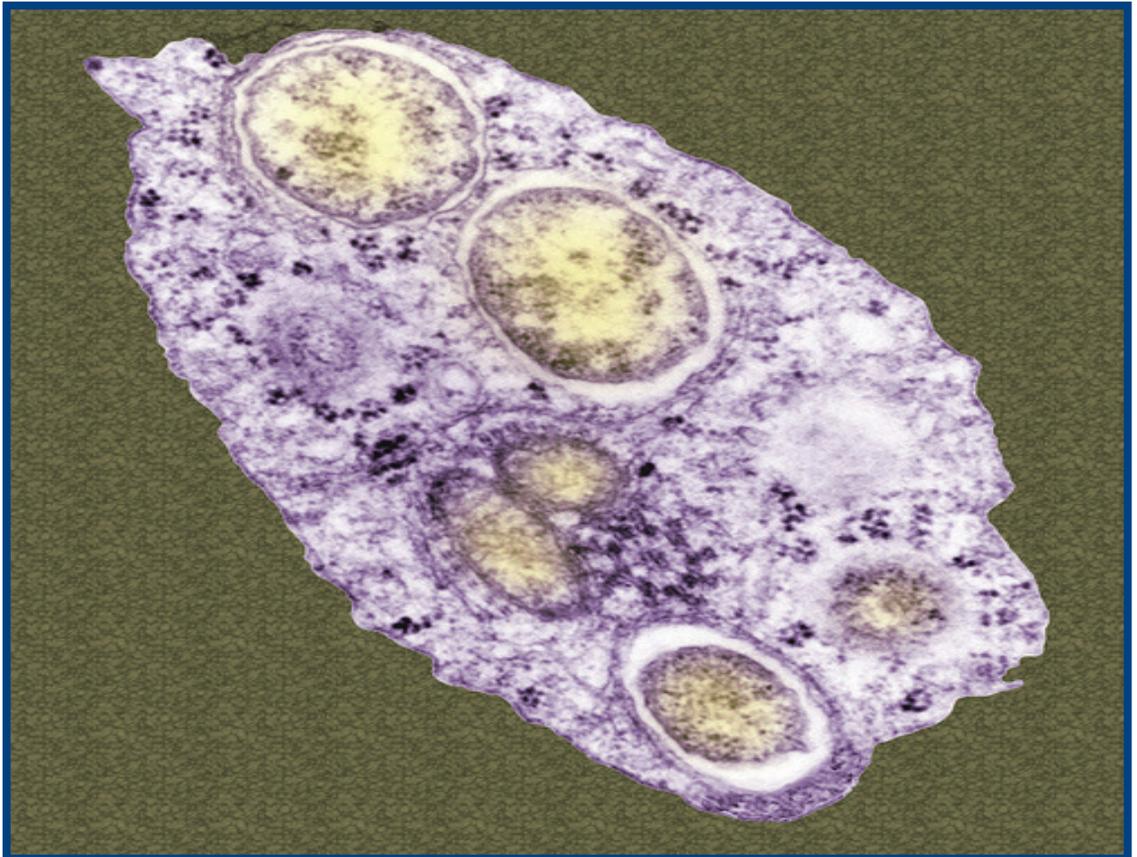
CIRCULAR TÉCNICA

86

São Carlos, SP
Fevereiro, 2020

Padronização das análises moleculares para a pesquisa de *Wolbachia* em artrópodos parasitas de interesse pecuário

Lea Chapaval Andri
Luciana Gatto Brito
Fábio da Silva Barbieri
Wilson Malagó Júnior
Talita Barban Bilhassi



Padronização das análises moleculares para a pesquisa de *Wolbachia* em artrópodes parasitas de interesse pecuário¹

Introdução

Insetos e outros artrópodes são hospedeiros comuns de bactérias transmitidas por via materna (DURON; HURST, 2013). Esses endossimbiontes hereditários podem ter uma forte influência na ecologia do hospedeiro. Tais bactérias transmitidas verticalmente são numerosas e dependentes do hospedeiro para sobrevivência e transmissão. Certas associações são obrigatórias para ambos os parceiros, e geralmente envolvem um benefício nutricional para o hospedeiro. Outras bactérias hereditárias são facultativas e variam, em associações, de mutualistas a parasitas quando observadas sob a perspectiva do hospedeiro. Entre estas, a *Wolbachia* é a mais comum e a mais difundida simbiote facultativa de insetos e artrópodes (HILGENBOECKER et al., 2008; ZUG; HAMMERSTEIN, 2012).

Wolbachia é um gênero diverso e antigo com possivelmente mais de 200 milhões de anos. São Alfa-proteobactérias Gram-negativas intracelulares (da ordem de Rickettsiales) associadas a artrópodes e a nematóides filariais. As células de *Wolbachia* se assemelham a pequenas esferas de 0,2 a 1,5 µm e ocorrem em todos os tipos de tecido, mas tendem a ser mais prevalentes nos ovários e testículos de hospedeiros infectados, e estão intimamente associadas com a linha germinativa feminina (HARRIS et al, 2010; SACCHI

¹ Médica Veterinária, D.Sc. em Ciências, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, lea.chapaval@embrapa.br

² Veterinária, D.Sc. em Ciências Veterinárias, pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, luciana.gatto@embrapa.br

³ Médico Veterinário, D.Sc. em Ciências Veterinárias, pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, fabio.barbieri@embrapa.br

⁴ Biólogo, D.Sc. em Ciências, analista da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, wilson.malago@embrapa.br

⁵ Zootecnista, D.Sc. em Genética e Melhoramento Animal, docente da FMU Centro Universitário, São Paulo, SP, talitabarban@yahoo.com.br

et al., 2010). Estima-se que *Wolbachia* infecte entre 40% e 66% das espécies de insetos [24-27]. Dentro de uma espécie ou população, a prevalência de infecção de *Wolbachia* pode ser bastante variável (KRIESNER et al., 2016; TURELLI; HOFFMANN, 1991; TURELLI; HOFFMANN, 1995). Os efeitos mais comumente documentados de *Wolbachia* em hospedeiros artrópodes são: parasitismo reprodutivo, que envolve a manipulação da reprodução do hospedeiro aumentando a transmissão e a persistência dos simbiontes, em geral, aumentando a relativa frequência de fêmeas infectadas por *Wolbachia* vs. não infectadas. As fêmeas são tipicamente os indivíduos que podem transmitir *Wolbachia* e outras bactérias hereditárias, embora existam raras exceções (HOFFMANN; TURELLI, 1988; MORAN; DUNBAR, 2006). *Wolbachia* emprega todos os quatro tipos de manipulação reprodutiva (SARIDAKI; BOURTZIS, 2010; WERREN; BALDO; CLARCK, 2008): 1) feminização, que resulta em machos genéticos que se desenvolvem e funcionam como fêmeas e ocorrem nas ordens Hemiptera, Lepidoptera e Isopoda; 2) a partenogênese, que ocorre em hospedeiros haplo-diplóides (por exemplo, Acari, Hymenoptera e Thysanoptera), em que ovos não fertilizados, que de outra forma se transformariam em machos, se desenvolvem em fêmeas; 3) matança masculina (*male killing*), que elimina machos infectados para a vantagem de sobreviventes de fêmeas infectadas e ocorre em Coleoptera, Diptera, Lepidoptera e Pseudoscorpionese 4) incompatibilidade citoplasmática (IC) (YEN; BARR, 1971) que previne machos infectados produzindo descendentes viáveis no acasalamento com fêmeas sem *Wolbachia* ou uma estirpe compatível de *Wolbachia*. A IC é o mais comumente relatado fenótipo reprodutivo induzido por *Wolbachia*, e é encontrado em Acari, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Isopoda, Lepidoptera e Orthoptera.

Existem duas formas pelas quais a bactéria pode ser transmitida para novos hospedeiros. A primeira delas é a transmissão vertical (da mãe para a sua prole via citoplasma dos ovos), que é a mais comumente utilizada e pode ser fortemente influenciada por fatores como temperatura, ocorrência de antibióticos naturais, tempo de duração da relação simbiótica, competição com outros simbiontes, etc. (CLANCY; HOFFMAN, 1996; POINSOT et al., 1998; CHARLAT et al., 2007).

A outra forma é a transmissão horizontal (entre espécies), que, embora menos frequente, pode ser evidenciada por duas maneiras: espécies hospedeiras proximalmente relacionadas frequentemente diferem no status da infecção ou possuem linhagens de *Wolbachia* distalmente relacionadas (WEST et al., 1998; ZHOU; ROUSSET; O'NEILL, 1998); e a filogenia molecular dos hospedeiros e das linhagens de *Wolbachia* que os mesmos possuem é extremamente incongruente (O'NEILL et al., 1992; STOUTHAMER; WERREN, 1993), esta forma de transmissão caracteriza o processo de "infecção" por *Wolbachia*.

A possibilidade de a maioria dos artrópodes albergarem *Wolbachia*, associada à sua capacidade de manipular o sistema reprodutivo do hospedeiro, coloca este simbiote entre os alvos mais promissores para ser utilizado no controle de importantes parasitas de interesse pecuário, tais como a mosca-dos-chifres, a mosca-dos-estábulos, a mosca-da-bicheira e também a mosca doméstica (BOURTZIS, 2008).

O potencial de *Wolbachia* como um agente bio-controlador foi previamente reconhecido graças à sua distribuição polifilética e à manipulação do sistema reprodutivo do hospedeiros (SARIDAKI; BOURTZIS, 2010). Muitas estratégias para controle e manejo de pestes e doenças vêm sendo propostas, a maioria delas tirando vantagem de linhagens virulentas de *Wolbachia* ou da indução da incompatibilidade citoplasmática (BOURTZIS, 2008). Além disso, estudos de controle de mosquitos vetores de doenças estão mais voltados para estratégias que reduzam a longevidade dos adultos em vez de diminuir sua abundância populacional (MCMENIMAN et al., 2009; WALKER; MOREIRA, 2011). Porém, estudos experimentais de interações hospedeiro-*Wolbachia* ainda são necessários para esclarecer os mecanismos moleculares utilizados pela bactéria para manipular o mecanismo citoplasmático do hospedeiro e assegurar a transmissão vertical, uma vez que ainda são desconhecidos (SARIDAKI; BOURTZIS, 2010).

1 Identificação de *Wolbachia* em artrópodes de interesse pecuário

Desconhece-se a taxa e a frequência de infecção por *Wolbachia* nas espécies de artrópodes parasitas que infestam os bovinos no Brasil, entre as quais pode-se destacar: 1) *Rhipicephalus microplus*, o carrapato-dos-bovinos; 2) *Cochliomyia hominivorax*, a mosca-da-bicheira; 3) *Haematobia irritans*, a mosca-dos-chifres; 4) *Stomoxys calcitrans*, a mosca-dos-estábulo; 5) *Musca domestica*, a mosca doméstica.

A abordagem diagnóstica escolhida para a identificação de *Wolbachia* nas espécies de artrópodes parasitas citadas foi a técnica da reação em cadeia da polimerase qualitativa (PCR), que foi utilizada para a padronização do uso de *primers* e outros parâmetros da reação e da metodologia empregada; também teve o objetivo de estabelecer a presença ou ausência de *Wolbachia* nos parasitas estudados em tempo real (RT PCR), para dar início à quantificação de *Wolbachia* nos diferentes hospedeiros. Para tal, *primers* diagnósticos gerais e específicos foram desenhados com o uso do *software* a partir de diferentes sequências de nucleotídeos de *Wolbachia* identificadas em *Drosophila melanogaster*, *Exorista sorbillans*, *H. irritans* e *R. microplus* depositadas no banco público de nucleotídeos *GenBank* (AE017196.1, AY194850.1, DQ380856.1 e, JF511466.1).

Tabela 1. Sequência dos iniciadores específicos (primers) gerais desenhados para detecção por reação em cadeia da polimerase qualitativa (PCR) e em Tempo Real (qPCR).

Nome	Sequência	Amplicon	Tm	Seq GenBank	Ensaio
Wolb-geral LGB 001 FOR	5' TGT TGT TTA GTG CTT GGT GAG C 3'	86 pb	58,8°C	AY194850.1 Wolbachia endosymbiont of Exorista sorbillans genomic sequence	RT PCR
Wolb-geral LGB 001 REV	5' AGC TTG TCA CAA CTT TCC GT 3'				
Wolb-geral LGB 002 FOR	5' TGT CAG TAG CAG AAA TGG GGA 3'	123 pb	61,9°C	AE017196.1 Wolbachia endosymbiont of Drosophila melanogaster, complete genome	PCR
Wolb-geral LGB 002 REV	5' CGT ATA CTT TTA TCT TCG CTT TGC C 3'				
Wolb-RM LGB 003 FOR	5' AGC GGT GAG TCG TTA TTC GG 3'	251 pb	60,1°C	JF511466.1 Wolbachia endosymbiont of Rhipicephalus sanguineus isolate T31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	PCR
Wolb-RM LGB 003 REV	5' AAT CTT GGT TGC TCC CCA CG 3'				
Wolb-RM LGB 004 FOR	5' GGG CTG AGT CGT TAT TCG G 3'	90 pb	61,3°C	JF511466.1 Wolbachia endosymbiont of Rhipicephalus sanguineus isolate T31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	RT PCR
Wolb-RM LGB 004 REV	5' TCC AAG GTT AAG CCT CGG GAT 3'				
Wolb-HI LGB 005 FOR	5' TGG TGT TGG TGT TGG TGC AG 3'	248 pb	59,9°C	DQ380856.1 Wolbachia endosymbiont of Haematobia irritans outer surface protein precursor (wsp) gene, partial cds	PCR
Wolb-HI LGB 005 REV	5' GTGCTAAAGAACAACAGTGC 3'				
Wolb-HI LGB 006 FOR	5' GCT GGA GCT CGT TAT TTC GG 3'	112 pb	59,3°C	DQ380856.1 Wolbachia endosymbiont of Haematobia irritans outer surface protein precursor (wsp) gene, partial cds	RT PCR/ PCR
Wolb-HI LGB 006 REV	5' GTG CTG TAA AGA ACAA CAG TGCT 3'				
Wolb-DIP LGB 007 FOR	5' TGT TGT TTA GTG CTT GGT GAG C 3'	86 pb	57,8°C	AY194850.1 Wolbachia endosymbiont of Exorista sorbillans genomic sequence	RT PCR
Wolb-DIP LGB 007 REV	5' AGC TTG TCA CAA CTT TCC GT 3'				
Wolb-DIP LGB 008 FOR	5' GCA TCA GAA GCT ATG CAG TAC G 3'	143 pb	58,4°C	AY194850.1 Wolbachia endosymbiont of Exorista sorbillans genomic sequence	PCR
Wolb-DIP LGB 008 REV	5' AGC TTG TCA CAA CTT TCC GTT 3'				

Realizou-se o alinhamento das sequências com o algoritmo Clustal-W (NASStar Inc., Madison, WI, EUA) para a identificação das regiões conservadas. A obtenção dos *primers* foi realizada com o *software Primer Blast* (YE et al., 2013), sendo que, para os *primers* utilizados na qPCR, a temperatura de anelamento (*Temperature of melting* – Tm) foi o parâmetro limitante. As Tms teóricas dos *amplicons* de cada um dos *primers* foram estimadas com o uso do mesmo *software*, *Primer Blast* (Tabela 1).

2 Padronização dos *primers* para detecção de *Wolbachia*

A pesquisa de *Wolbachia* utilizando os ensaios PCR e qPCR foi realizada em todas as espécies-alvo escolhidas como principais ectoparasitas de interesse pecuário (SisGen Acesso n° A4AF0D5). E, apesar de alguns *primers* terem sido desenhados com o propósito de serem utilizados em ensaios de RT PCR, todos foram avaliados também através da PCR convencional.

A padronização de eficiência de detecção da presença de *Wolbachia* utilizando-se cada um dos *primers* foi realizada com 10 indivíduos adultos de cada uma das espécies-alvo pesquisadas. A extração de DNA genômico foi individual para as moscas utilizando o indivíduo inteiro, sendo que, para a extração de DNA de *R. microplus*, foram usados os ovários e ovidutos de fêmeas ingurgitadas. Todos os indivíduos e suas partes foram maceradas em tampão de isolamento de DNA, de acordo com a metodologia descrita por Li et al. (2003). Priorizando a extração, os espécimes foram armazenados a temperaturas de - 80°C em tubos plásticos identificados até o momento da extração. As amostras foram transferidas para placas de Petri previamente resfriadas em gelo seco e colocadas em microtubos de 1,5 mL, também pré-resfriados e mantidos em gelo seco. Então foram esmagadas com o pistilo plástico descartável previamente resfriado em gelo seco por aproximadamente 15 segundos. A extração de DNA foi feita com a adição de 25 µL do buffer de isolamento de DNA e novamente as amostras foram esmagadas com o pistilo gelado por mais 15 segundos. Teve-se a preocupação de observar se todos os tecidos foram totalmente fragmentados e então o tubo foi novamente transferido para o gelo seco até que todas as amostras estivessem processadas. Os tubos foram rapidamente centrifugados (cerca de 1 minuto) para mistura total dos tecidos macerados com o tampão de isolamento e transferidos para o banho-maria (temperatura de ebulição), onde as amostras permaneceram por um período de três a cinco minutos. O DNA total extraído foi mantido em freezer a - 20°C para uso imediato ou por até dois dias ou a - 80°C, quando o tempo para a realização dos ensaios PCR ou qPCR excedeu 48 horas. Para a realização das provas moleculares, as amostras com o DNA total foram centrifugadas a 4°C por 14.000 rpm por 4 minutos.

Para os ensaios de PCR convencional, a reação foi otimizada para um volume final de 20 µL, utilizando 4µL de DNA em uma concentração final de 50 ng.

Para a obtenção da temperatura de anelamento (T_m) ideal, utilizou-se gradiente de T_m nas reações de PCR que variaram entre + 5°C e - 5°C em relação à T_m estimadas pelo *software Primer Blast* para a obtenção dos *amplicons* de cada um dos *primers*. Foram então estabelecidas as T_m ideais para cada um dos *primers* em que se obteve amplificação dos fragmentos esperados (Tabela 2).

Tabela 2. Temperaturas de anelamento (*Melting Temperature – T_m*) estabelecidas para cada um dos *primers* aptos a detectar a presença de *Wolbachia* em indivíduos das espécies alvo de artrópodes parasitas de interesse pecuário.

Nome	T _m	Obtenção de amplicons de PCR para
Wolb-geral LGB 001 FOR Wolb-geral LGB 001 REV	58°C	<i>Cochliomyia hominivorax</i> , <i>Stomoxys calcitrans</i> , <i>Haematobia irritans</i> e <i>Musca domestica</i>
Wolb-geral LGB 002 FOR Wolb-geral LGB 002 REV	60°C	
Wolb-RM LGB 003 FOR Wolb-RM LGB 003 REV	61,9°C	Sem amplificação
Wolb-RM LGB 004 FOR Wolb-RM LGB 004 REV	61,3°C	
Wolb-HI LGB 005 FOR Wolb-HI LGB 005 REV	60,0°C	<i>Stomoxys calcitrans</i> , <i>Haematobia irritans</i> e <i>Musca domestica</i>
Wolb-HI LGB 006 FOR Wolb-HI LGB 006 REV	59,0°C	
Wolb-DIP LGB 007 FOR Wolb-DIP LGB 007 REV	57,8°C	Sem amplificação
Wolb-DIP LGB 008 FOR Wolb-DIP LGB 008 REV	58,4°C	

As reações de qPCR também foram otimizadas para um volume final de reação de 20 µL, utilizando 4µL de DNA em uma concentração final de 50 ng. Inicialmente, estabeleceram-se as melhores condições para a PCR, testando-se temperaturas de anelamento entre 52°C e 62°C para todos os oligonucleotídeos iniciadores e todas as concentrações de DNA obtidas. A amplificação dos fragmentos-alvo foi realizada no programa e foi utilizada a desnaturação inicial do DNA a 95°C por 3 min, seguida de 30 ciclos (95°C – 25 seg., gradiente – 20 seg. e 72°C – 25 seg.), e de extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, com brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultra-violeta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100 pb DNA Ladder (BioLabs®)

e Invitrogen®). Com o intuito de realizar detecção dos produtos de PCR, 8 µL do produto amplificado pela reação de PCR e observado por eletroforese em gel de agarose 2% (GIBCO BRL - Life Technologies, Inc., MD, U.S.A.) em TAE 1x (para 50 X, 242 g Tris; 37,2 g EDTA [Na₂], 800 mL de água MilliQ autoclavada, 57% de ácido acético, pH 8,1) e um padrão molecular 1kb DNA (GIBCO BRL - Life Technologies, Inc., MD, U.S.A.) foi usado como marcador molecular. A eletroforese foi realizada em cuba eletroforética Pharmacia Biotech (max submarine unit HE 99 X), com fonte Pharmacia Biotech (EPS 300) nas condições de 70 V por 2 horas.

O desempenho de cada um dos *primers* avaliados em relação aos ensaios e a cada uma das espécies-alvo de artrópodes parasitas de interesse pecuário em que foi pesquisada a frequência de infecção por *Wolbachia* é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Desempenho dos *primers* avaliados nos diferentes ensaios de reação em cadeia da polimerase para detecção de *Wolbachia* em diferentes espécies de artrópodes de interesse pecuário.

Nome	Espécie-alvo	PCR	qPCR
Wolb-geral LGB 001 FOR	<i>Cochliomyia hominivorax</i> (+) (1), <i>Stomoxys calcitrans</i> (+), <i>Haematobia irritans</i> (++) ⁽²⁾ e <i>Musca domestica</i> (++)	++	+
Wolb-geral LGB 001 REV			
Wolb-geral LGB 002 FOR	<i>Cochliomyia hominivorax</i> (+), <i>Stomoxys calcitrans</i> (+), <i>Haematobia irritans</i> (+) e <i>Musca</i> <i>domestica</i> (+)	+	-
Wolb-geral LGB 002 REV			
Wolb-RM LGB 003 FOR	Não houve amplificação	-	-
Wolb-RM LGB 003 REV			
Wolb-RM LGB 004 FOR	Não houve amplificação	-	-
Wolb-RM LGB 004 REV			
Wolb-HI LGB 005 FOR	<i>Haematobia irritans</i> (+), <i>Stomoxys calcitrans</i> (+) e <i>Musca domestica</i> (++)	+	-
Wolb-HI LGB 005 REV			
Wolb-HI LGB 006 FOR	<i>Haematobia irritans</i> (+), <i>Stomoxys calcitrans</i> (+) e <i>Musca domestica</i> (+++) ⁽³⁾	+	+++
Wolb-HI LGB 006 REV			
Wolb-DIP LGB 007 FOR	Não houve amplificação	-	-
Wolb-DIP LGB 007 REV			
Wolb-DIP LGB 008 FOR	Não houve amplificação	-	-
Wolb-DIP LGB 008 REV			

(1) + obtenção de produtos de amplificação dentro do tamanho esperado e com a presença de algumas bandas inespecíficas.

(2) ++ - obtenção de produtos de amplificação dentro do tamanho esperado e sem a presença de bandas inespecíficas.

(3) +++ - excelente amplificação com obtenção de produtos de amplificação dentro do tamanho esperado e sem a presença de bandas inespecíficas.

3 Validação do diagnóstico molecular de *Wolbachia* para populações de dípteras de interesse pecuário

A ausência de bandas quando os *primers* foram testados frente ao DNA de *R. microplus*, mostra que não houve amplificação de *Wolbachia* neste parasita. Mais testes deverão ser feitos com *primers* já citados em literaturas, novas condições de PCR e até novos simbiontes com potencial de controle sobre a reprodução ou metabolismo do carrapato dos bovinos.

Após a seleção dos *primers* de melhor desempenho para a detecção de *Wolbachia* em populações de *H. irritans*, *S. calcitrans*, *M. domestica* e *C. hominivorax*, realizou-se a validação deles com populações de campo dessas espécies. Para tal, foram colhidos espécimes adultos das dípteras citados em dois diferentes rebanhos bovinos para a extração de DNA utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente. As amostras de DNA obtidas de cada uma das espécies de dípteras parasitas de bovinos foram submetidas à amplificação em PCR convencional e também em RT PCR.

O primer de melhor desempenho para uso em PCR convencional foi o primer Wolb-geral LGB 001, pelo qual conseguimos observar uma frequência de infecção nas espécies de artrópodes parasitas avaliadas variando ente 89,1% e 95,6% (Tabela 4). A presença de *Wolbachia* através da PCR quantitativa foi detectada pela presença ou pela ausência de bandas específicas para o primer escolhido Wolb-geral LGB 001.

Tabela 4. Frequência de infecção por *Wolbachia* em diferentes espécies de dípteras de interesse pecuário.

Espécie	Frequência de infecção por <i>Wolbachia</i>
<i>Musca domestica</i>	89,1% (82 em 96 indivíduos testados)
<i>Cochliomyia hominivorax</i>	93% (80 em 86 indivíduos testados)
<i>Stomoxys calcitrans</i>	94,8 (91 em 96 indivíduos testados)
<i>Haematobia irritans</i>	95,6% (44 em 46 indivíduos testados)

Na biologia molecular, a PCR em tempo real quantitativa (real time PCR ou qPCR) é uma técnica laboratorial baseada PCR para amplificar ácidos nucleicos. A qPCR combina a metodologia de PCR convencional com um mecanismo de detecção e quantificação através da emissão de fluorescência, permitindo o monitoramento da reação em tempo real. Desta forma, a cada ciclo de amplificação são gerados dados, os quais podem ser analisados em tempo real, ao contrário da PCR convencional, em que a análise é realizada somente ao final da reação, geralmente por eletroforese em gel. A qPCR permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA sejam realizados em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados, diminuindo o risco de contaminação da amostra e garantindo maior precisão. A detecção da amplificação na qPCR pode estar baseada no uso de sondas fluorescentes específicas para uma região da molécula que está sendo amplificada, ou com o uso de reagentes fluorescentes que se intercalam na molécula de DNA. Dentre estes últimos, o sistema *Sybr Green* é um dos mais utilizados para detecção do VHB e outros vírus por qPCR (SHAHZAMANI, 2011; WANG; GIAMBRONE; SMITH, 2002).

O *Sybr Green* possui ligação altamente específica ao DNA dupla-fita sendo utilizado para detectar o produto da PCR do VHB conforme ele se acumula durante os ciclos da reação. Para todas as reações utilizando este sistema de detecção deve-se realizar a análise da curva de melting como controle de especificidade para o fragmento amplificado de acordo com o tamanho do fragmento (PAUDEL et al., 2011). A análise de curva de *melting* permite a identificação do fragmento de *Wolbachia* amplificado através de uma temperatura específica (temperatura de *melting*, T_m), podendo também distinguir sequências de composições semelhantes com bases na diferença de suas temperaturas de dissociação. A T_m é a temperatura na qual metade das fitas de DNA está na forma de fitas simples e a outra metade na forma de dupla hélice. A T_m é dependente da composição do DNA, de modo que um aumento do conteúdo de G+C no DNA gera um incremento na T_m ocasionado pelo maior número de ligações de ponte de H (PAUDEL et al., 2011, PÉREZ et al., 2011).

Em relação à qPCR, o *primer* de melhor desempenho para detecção da presença de *Wolbachia* nas diferentes espécies de dípteras avaliadas também foi o *primer* *Wolb-geral* LGB 001 (Figura 1).

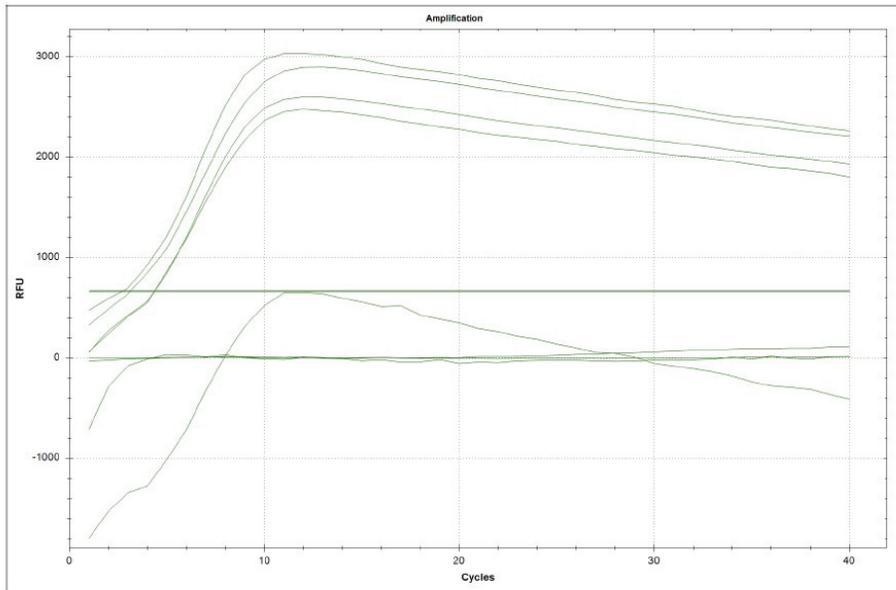


Figura 1. Amplificações dos produtos da qPCR de *Wolbachia* em *Stomoxys calcitrans*. Para todas as amostras foram consideradas positivas baseadas no ponto de corte ou ponto no tempo, onde a ligação cruza o limiar da detecção (Threshold) (Cq=39).

Perspectivas futuras

Ensaio continuam sendo realizados com os melhores *primers* utilizados neste estudo e outros iniciadores, propostos em literatura para diferentes insetos, para detecção e quantificação de *Wolbachia* em parasitas de interesse pecuário. Por envolver um estudo inédito desde endossimbionte no Brasil, estudos detalhados devem ser feitos a cada etapa da pesquisa para obtenção de um resultado preciso e fidedigno. Trabalhos de pesquisa estão sendo realizados pelo grupo da Embrapa envolvendo cientistas de outras Instituições com a finalidade da detecção a ocorrência da infecção natural de *Wolbachia* nas espécies de importância e posterior estudo biológico.

Referências

- BOURTZIS, K. *Wolbachia*-based technologies for insect pest population control. In: ALKSOY, S. (Ed.). **Transgenesis and the Management of Vector-Borne Disease**. Texas: Springer Science, 2008. p.104-113. (Transgenesis and the management of vector-borne disease, v.627).
- CHARLAT, S.; DAVIES, N.; RODERICK, G. K.; HURST, G. D. D. Disrupting the timing of *Wolbachia*-induced male-killing. **Biology Letters**, v.3, p.154-156, jan. 2007.
- CLANCY, D. J.; HOFFMAN, A. A. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: evolving complexity. **Trends in Ecology & Evolution**, v.11, n.4, p.145-146, apr. 1996.
- DURON, O.; HURST, G. D. Arthropods and inherited bacteria: from counting the symbionts to understanding how symbionts count. **BMC Biology**, v.11, p.45, apr. 2013.
- HARRIS, H. L.; BRENNAN, L. J.; KEDDIE, B. A.; BRAIG, H. R. Bacterial symbionts in insects: balancing life and death. **Symbiosis**, v.51, n.1, p.37-53, july 2010.
- HILGENBOECKER, K.; HAMMERSTEIN, P.; SCHLATTMANN, P.; TELSCHOW, A.; WERREN, J. H. How many species are infected with *Wolbachia*? a statistical analysis of current data. **FEMS Microbiology Letters**, v.281, n.2, p.215-220, apr. 2008.
- HOFFMANN, A. A.; TURELLI, M. Unidirectional incompatibility 860 in *Drosophila simulans*: inheritance, geographic variation and fitness effects. **Genetics**, v.119, n.2, p.435-444, june 1988.
- JEYAPRAKASH, A.; HOY, M. A. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixtythree arthropod species. **Insect Molecular Biology**, v.9, n.4, p.393-405, aug. 2000.
- KRIESNER, P.; CONNER, W. R.; WEEKS, A. R.; TURELLI, M.; HOFFMANN, A. A. Persistence of a *Wolbachia* infection frequency cline in *Drosophila melanogaster* and the possible role of reproductive dormancy. **Evolution**, v.70, n.5, p.979-997, may 2016.
- KUBISTA, M.; ANDRADE, J.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STÄHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, n.2-3, p.95-125, apr./jun., 2006.
- LI, A. Y.; GUERRERI, F. D.; ALMAZAN, C. A.; GEORGE, J. E. Survey of resistance to permethrin and diazinon and the use of a multiplex polymerase chain reaction assay to detect resistance alleles in the horn fly, *Haematobia irritans irritans* (L.). **Journal of Medical Entomology**, v.40, n.6, p.942-949, nov. 2003.
- MCMENIMAN, C. J.; LANE, R. V.; CASS, B. N.; FONG, A. W.; SIDHU, M.; WANG, Y. F.; O'NEILL, S. L. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. **Science**, v.323, n.5910, p.141-144, jan. 2009.
- MORAN, N. A.; DUNBAR, H. E. Sexual acquisition of beneficial symbionts in aphids. **PNAS**, v.103, n.34, p.12803-12806, aug. 2006.
- O'NEILL, S. L.; GIORDANO, R.; COLBERT, A. M.; KARR, T. L.; ROBERTSON, H. M. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.89, n.7, p.2699-2702, apr. 1992.

PAUDEL, D.; JARMAN, R.; LIMKITTIKUL, K.; KLUNGTHONG, C.; CHAMNANCHANUNT, S.; NISALAK, A.; GIBBONS, R.; CHOKEJINDACHAI, W. Comparison of real-time SYBR green dengue assay with real-time taqman RT-PCR dengue assay and the conventional nested PCR for diagnosis of primary and secondary dengue infection. **North American Journal of Medicine and Sciences**, v.3, n.10, p.478-485, oct. 2011.

PÉREZ, L. J.; DÍAZ DE ARCE, H.; TARRADAS, J.; ROSELL, R.; PERERA, C. L.; MUÑOZ, M.; FRÍAS, M. T.; NUÑEZ, J. I.; GANGES, L. Development and validation of a novel SYBR Green real-time RT-PCR assay for the detection of classical swine fever virus evaluated on different real-time PCR platforms. **Journal of Virology Methods**, v.174, n.1-2, p.53-59, june 2011.

POINSOT, D.; BOUTZIS, K.; MARKAKIS, G.; SAVAKIS, C.; MERÇOT, H. *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. **Genetics**, v.150, n.1, p.227-237, sep. 1998.

SACCHI, L.; GENCHI, M.; CLEMENTI, E.; NEGRI, I.; ALMA, A.; OHLER, S.; SASSERA, D.; BOURTZIS, K.; BANDI C. Bacteriocyte-like cells harbour *Wolbachia* in the ovary of *Drosophila melanogaster* (Insecta, Diptera) and *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera). **Tissue and Cell**, v.42, n.5, p.328-333, oct. 2010.

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

SHAHZAMANI, K.; SABAH, F.; MERAT, S.; SADEGHIZADEH, M.; LASHKARIAN, H. E.; REZVAN, H.; SAMIEE, S. M.; ARZANANI, M. K.; JABBARI, H.; MALEKZADEH, R. Rapid low-cost detection of hepatitis C virus RNA in HCV-infected patients by real-time RT-PCR using SYBR Green I. **Archives of Iranian Medicine**, v.14, n.6, p.396-400, nov. 2011.

STOUTHAMER, R.; WERREN, J. H. Microbes associated with parthenogenesis in wasps of the genus *Trichogramma*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.61, n.1, p.6-9, jan. 1993.

TURELLI, M.; HOFFMANN, A. A. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: dynamics and parameter estimates from natural populations. **Genetics**, v.140, n.4, p.1319-1338, aug. 1995.

TURELLI, M.; HOFFMANN, A. A. Rapid spread of an inherited incompatibility factor in 856 California *Drosophila*. **Nature**, v.353, p.440-442, oct. 1991.

WALKER, T.; MOREIRA, L. A. Can *Wolbachia* be used to control malaria?. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, supl.1, p.212-217, aug. 2011.

WANG, C. Y.; GIAMBRONE, J. J.; SMITH, B. F. Detection of duck hepatitis B virus DNA on filter paper by PCR and SYBR green dye-based quantitative PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.7, p.2584-90, july 2002.

WERREN, J. H.; WINDSOR, D. M. *Wolbachia* infection frequency in insects: evidence of a global equilibrium? **Proceedings Biological Sciences**, v.267, n.1450, p.1277-1285, july 2000.

WERREN, J. H.; BALDO, L.; CLARK, M. E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, p.741-751, oct. 2008.

WEST, S. A.; COOK, J. M.; WERREN, J. H.; GODFRAY, H. C. *Wolbachia* in two insect host-parasitoid communities. **Mol. Ecol.**, v.7, n.11, p.1457-1465, nov. 1998.

ZHOU, W.; ROUSSET, F.; O'NEILL, S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. **Proc. Biol. Sci.**, v.22, n.265, p.509-515, mar. 1998.

ZUG, R.; HAMMERSTEIN, P. Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. **PLoS ONE**, v.7, n.6, p.e38544, 2012.

YE, Y. H.; WOOLFIT, M.; RANCÈS, E.; O'NEILL, S. L.; MCGRAW, E. A. *Wolbachia*-associated bacterial protection in the mosquito *Aedes aegypti*. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v.7, e2362, aug. 2013.

YEN, J. H.; BARR, A. R. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in culex pipiens L. **Nature**, v.232, p.657-658, aug. 1971.

Embrapa Pecuária Sudeste
Rod. Washington Luiz, km 234,
Caixa Postal 339
13560-290, São Carlos, SP
Fone: (16) 3411-5600
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição
1ª edição on-line: 2020



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações
da Embrapa Pecuária Sudeste
Presidente

Alexandre Berndt

Secretário-Executivo

Simone Cristina Méo Niciura

Membros

*Mara Angélica Pedrochi, Maria Cristina
Campanelli Brito, Milena Ambrosio Telles, Simone
Cristina Méo Niciura, Sílvia Helena Piccirillo
Sanchez*

Normalização bibliográfica

Mara Angélica Pedrochi

Editoração eletrônica

Maria Cristina Campanelli Brito

Foto da capa

Léa Chapaval Andri

CGPE: 15852