



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ZOOLOGIA



**ESCORPIÕES DO COMPLEXO *TITYUS STIGMURUS*
(BUTHIDAE): DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES E
RELAÇÃO COM BACTÉRIAS DO GÊNERO *WOLBACHIA***



GRACIELLE DE FÁTIMA BRAGA PEREIRA

BELO HORIZONTE

2015

Gracielle de Fátima Braga Pereira

Escorpiões do complexo *Tityus stigmurus* (Buthidae):
Delimitação de espécies e relação com bactérias do gênero
Wolbachia

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Zoologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade
Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para a obtenção
do título de mestre em Zoologia.**

Orientador: Adalberto José dos Santos

Belo Horizonte

2015

- 043 Pereira, Gracielle de Fátima Braga.
Escorpiões do complexo *Tityus stigmurus* (Buthidae): delimitação de espécies e relação com bactérias do gênero *Wolbachia* [manuscrito] / Gracielle de Fátima Braga Pereira. - 2015.
120 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Adalberto José dos Santos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.
1. Zoologia. 2. Escorpiões. 3. Filogenia. 4. DNA Mitocondrial. 5. Partenogênese. 6. *Wolbachia*. 7. Reação em Cadeia da Polimerase. I. Santos, Adalberto José dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 591

Escorpiões do complexo *Tityus stigmurus* (Buthidae): Delimitação de espécies e relação com bactérias do gênero *Wolbachia*

AUTOR: GRACIELLE DE FÁTIMA BRAGA PEREIRA

Esta dissertação foi apresentada em sessão pública e submetida a avaliação em 29 de maio de 2015, pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:



Prof. Dr. Adalberto José dos Santos (Orientador / UFMG)



Prof. Dr. Almir Rogério Pepato (Membro – UFMG)



Prof. Dra. Gisele Pires de Mendonça Dantas (Membro – PUC/MG)

Para Bernardo e Sofia, que durante o mestrado eram apenas haploides. Hoje
são o meu mundo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, ao meu orientador Adalberto Santos. Obrigada pela paciência, ensinamentos e amizade ao longo desses anos. Pelas tardes disponibilizadas para discussões sobre cladística e delimitação de espécies. Por permitir que eu realizasse o trabalho do meu jeito, porém sempre me orientando em diversas situações.

Agradeço aos professores Fabrício Santos e Teofânia Vigidal, por terem aberto as portas de seus laboratórios para a realização dos procedimentos moleculares. Ao Daniel Coscarelli, que tão gentilmente me ensinou o início das práticas moleculares. À Eloisa Sari e ao José Eustáquio, por cuidarem das minhas placas de seqüenciamento.

Ao Programa de Pós Graduação em Zoologia da UFMG, pela oportunidade do mestrado. Ao apoio financeiro da Fapemig, Fapesp e CNPq, que possibilitaram coletas e experimentos. À CAPES, pela bolsa, que permitiu minha sobrevivência ao longo desses dois anos.

Obrigada a todos que enviaram escorpiões de diferentes localidades: Antônio Brescovit, pelos escorpiões de São Paulo. Hans Thomassen, por ter completado “minha coleção” ao coletar vários exemplares de *T. melici*, a única espécie que faltava para o trabalho. Warllem Junio e Nathalie Sena, pelos escorpiões de Natal. Ivânia Folster, pelos de Santa Catarina. Ao garoto Jonathan, de Januária, por ter doado um pote cheio de *Tityus serrulatus* machos. Aos que me doaram as belíssimas fotos para o trabalho, Tiago Porto (Tiko) e Leonardo Carvalho, e ao Danilo Ribeiro, por ter me ajudado a fotografar e editar as fotos dos exemplares fixados.

Agradeço aos companheiros das aulas de sistemática, principalmente à Graciela Bohórquez, Carla Melo e Vinícius Diniz. Vocês tornaram tudo mais fácil. Obrigada a toda equipe do laboratório de aracnologia, pelos diversos momentos de aprendizado e descontração. À Viviane Souza pela boa conversa e o cafezinho de sempre. À Ana Monteiro pela fugidinha do trabalho, em busca da meia-lua de queijo. Ao Ubirajara Oliveira pela modelagem de nicho (infelizmente não incluída nesse trabalho). Um muitíssimo obrigada ao Ivan Magalhães e Guilherme Azevedo (Doug), por terem me ajudado nos experimentos, e principalmente na utilização dos programas de sistemática molecular. Sem vocês dois não haveria essa dissertação.

Aos que passaram horas com luz UV exposta aos olhos: Ivan Magalhães, Marcus Thadeu, Bárbara Faleiro, Adalberto Santos, Guilherme Azevedo, Ana Monteiro, Pedro Martins, Almir Pepato, Tiago Porto e Leonardo Carvalho. Agradeço não somente pelas coletas, mas também pelas conversas, brincadeiras e comilança. E é claro, à dona Rosinha, que deixava todos em um ótimo estado de humor devido à sua comida deliciosa.

Aos meus amigos Carlos Alexandre, Ana Monteiro, Graciela Bohórquez, Yuri Messas, Carla Melo, Danilo Ribeiro e Luis Fernando García, por terem aguentado todas as minhas crises durante esses dois anos, por impedirem que o estresse me consumisse, e que a depressão me derrubasse. Aos dois últimos, não tenho palavras para agradecer o quanto me ajudaram, principalmente na reta final do mestrado.

Agradeço ao Renato Brito, por ouvir sobre escorpiões por horas e horas, dias e dias, finais de semana e finais de semana. Por todas as discussões sobre aracnídeos, *Wolbachia*, taxonomia, PCR, etc. Pela companhia nos laboratórios durante várias noites de trabalho intenso.

Aos meus pais (Teresinha Braga e Antônio Santos), que me incentivaram e apoiaram desde o início do mestrado, mesmo sabendo que os estudos envolviam um bicho “asqueroso, cruel e assassino”. Obrigada por terem sido sempre o meu apoio e por acreditarem em mim. Agradeço aos meus irmãos (Nilson Roberto e Ricardo Cristiano) por serem um exemplo de perseverança. Aos meus sobrinhos (Gabrielle e Pedro), obrigada pelos momentos alegres, e por me lembrarem de que existe vida além dos estudos.

A Deus, por tudo.

“Levallois começou a ler...

--AATAATAATAATGTCGTC...

...enquanto Lemoine digitava. Cerca de vinte minutos depois, Levallois suspirou um “Acabou”, e o biólogo acionou a tecla “Enter”. (...)

Na tela, uma palavra: Negativo. Decepção total.”

Franck Thilliez, trecho de “[GATACA]

“Mas agora, de repente, a equação muda. Agora podemos ter descendente que são nós. Podemos, como indivíduos, atingir uma certa imortalidade. (...) E é significativo que a clonagem seja a única forma de reprodução que não envolve o sexo. (...) As mulheres poderão ter filhos sem os homens.”

John Darnton, trecho de “O Experimento”

“-Quero que você espalhe pela cidade inteira que eu pago cinco reais a mais por cada “amarelinho” que for capturado vivo. (...)

-Mas, o que é esse negócio de “amarelinho”? Pergunta o desconfiado Bartolomeu

-É o escorpião, sua anta... -Responde o coronel. (...)

O engraçado é que a moeda que circulava nas negociações não era mais o dinheiro de papel – era apenas o escorpião. O bicho tornou-se, naqueles dias, uma moeda forte, de fazer inveja ao dólar.”

(Hélio Nobélio, trecho de “Telúrio e o Escorpião de Ouro”)

RESUMO

O complexo *Tityus stigmurus* recebe grande atenção na literatura por apresentar escorpiões de importância médica. O grupo é composto atualmente por seis espécies restritas ao Brasil: *Tityus aba*, *T. kuryi*, *T. martinpaechi*, *T. melici*, *T. serrulatus* e *T. stigmurus*. Entretanto, os limites entre as espécies do grupo são controversos. Dados de morfologia, principalmente de coloração e granulação do tegumento, tem se mostrado insuficientes para delimitar as espécies do grupo. O uso de dados moleculares pode contribuir para resolver os problemas de classificação do complexo. O DNA mitocondrial, por evoluir rapidamente, é uma fonte de dados adequada para estudar espécies crípticas ou de divergência recente. Por outro lado, a frequência gênica e distribuição de haplótipos desses marcadores podem sofrer influência de microrganismos intracelulares e em desequilíbrio de ligação. Recentemente, a bactéria intracelular *Wolbachia* foi encontrada em uma população do escorpião amarelo (*T. serrulatus*), sugerindo que a mesma seria responsável pela partenogênese nesta espécie. Além disso, essa bactéria é conhecida por causar varredura seletiva de alguns mitótipos em populações parasitadas. Neste trabalho, utilizei testes de amplificação dos genes bacterianos WSP e ftsZ para confirmar a presença de *Wolbachia* em tecidos de diferentes populações de *T. serrulatus* partenogenéticos. Além disso, testei populações sexuadas, bem como as demais espécies do complexo *T. stigmurus*. Todos os resultados foram negativos para *Wolbachia*, indicando que a partenogênese em *T. serrulatus* não pode ser atribuída à presença desta bactéria. Além disso, esses resultados mostram que genes mitocondriais podem ser usados com segurança nas análises filogenéticas do complexo, uma vez que suas histórias evolutivas não seriam afetadas por essa bactéria. Assim, utilizei os marcadores mitocondriais COI e 16S e o marcador nuclear ITS2 para testar hipóteses de delimitação de espécies dentro do complexo, a partir de topologias geradas por Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. Todas as análises indicam que o complexo *T. stigmurus* é monofilético. Porém, as topologias recuperam apenas *T. melici* e *T. kuryi* como monofiléticas. Análises de coalescência profunda indicaram a existência de três linhagens evolutivas, sendo duas linhagens referentes às espécies monofiléticas e a terceira linhagem composta pelas demais espécies do complexo. Com base nesses resultados, eu discuto nessa dissertação as relações filogenéticas do complexo *T. stigmurus*, comparando-as com dados morfológicos descritos na literatura e observados durante esse trabalho.

Palavras-chave: Bactéria intracelular, espécies crípticas, importância médica, partenogênese, PCR, sistemática molecular.

ABSTRACT

The *Tityus stigmurus* complex receives great attention in the literature due to its medical importance in scorpions. The group currently includes six species: *Tityus aba*, *T. kuryi*, *T. martinpaechi*, *T. melici*, *T. serrulatus* and *T. stigmurus*. However, the limits between species of the group are controversial. Morphological data, mostly from coloration and tegument granulation, have not been sufficient to define species within the group. The use of molecular data can contribute to resolve the complex internal classification. The fast-evolving mitochondrial DNA is an appropriate tool to study cryptic and recently diverging species, but it can be influenced by intracellular microorganisms in linkage disequilibrium. The intracellular bacteria *Wolbachia* was recently found in the yellow scorpion (*T. serrulatus*) and has been suggested as responsible for the parthenogenesis in this species. Additionally, this bacteria is known to cause selective sweep of mitotypes in parasitized populations. In this study I used the DNA amplification tests of the bacterial genes WSP and ftsZ to confirm the presence of *Wolbachia* in tissues of different populations of parthenogenetic *T. serrulatus*. This test was also performed for *T. serrulatus* sexual populations, as well as for other species of the complex. All results were negative for *Wolbachia*, indicating that the infection by this bacteria is not the cause of parthenogenesis in this *T. serrulatus*. These results also allow the use of mitochondrial genes to reliably infer phylogenetic relationships within the complex, since its evolutionary histories are not affected by this bacteria. Hence I used the mitochondrial markers COI and 16S and the nuclear ITS2 to test hypotheses of species delimitation within the complex from topologies generated by Maximum Likelihood and Bayesian Inference. All analyses indicate that the complex is monophyletic. However, only *T. kuryi* and *T. melici* are recuperated as monophyletic. Deep coalescence analyses indicate the existence of three evolutionary lineages within the complex, two of them corresponding to those monophyletic species and a third including the remaining species of the complex. Based on these results, I discuss in this dissertation the phylogenetic relationships of the *Tityus stigmurus* complex, comparing molecular results with morphological data present in the literature and observed during this study.

Key-words: Cryptic species, Intracellular bacteria, medical importance, molecular systematics, parthenogenesis, PCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Distribuição geográfica de espécimes de *Tityus serrulatus* amostrados neste estudo. Círculos vermelhos representam populações partenogenéticas, círculos azuis populações sexuadas 32

Figura 1.2: Gel de agarose apresentando bandas positivas para Citocromo Oxidase I de *Tityus serrulatus*. As amostras UFMG 12524 e UFMG 11106 pertencem a populações sexuadas; as demais pertencem a populações partenogenéticas 36

Figura 1.3: Gel de agarose apresentando bandas negativas para os marcadores WSP (A) e *ftsZ* (B), específicos para *Wolbachia*. Todos os exemplares são *T. serrulatus*. As amostras UFMG 12524 e UFMG 11106 pertencem a populações sexuadas; as demais pertencem a populações partenogenéticas 37

Figura 1.4: Gel de agarose apresentando bandas negativas para o marcador *ftsZ* específico para *Wolbachia*. As amostras analisadas pertencem às espécies do complexo *T. stigmurus* 38

Figura 1.5: Gel de agarose apresentando bandas positivas para o marcador WSP específico para *Wolbachia*. As amostras analisadas pertencem a espécimes de *T. serrulatus* cujo DNA foi extraído em conjunto com DNA de *Drosophila* sp. 38

Figura 2.1: Processo de evolução de linhagens monofiléticas a partir da especiação, ilustrado com escorpiões do complexo *Tityus stigmurus*. A- Polifiletismo entre *T. serrulatus* e *T. stigmurus*. B- *T. stigmurus* torna-se monofilético, enquanto *T. serrulatus* encontra-se parafilético. C- *T. serrulatus* torna-se monofilético. Os desenhos acima são apenas ilustrativos e não representam a história das duas espécies 54

Figura 2.2: Espécimes vivos de representantes do complexo *Tityus stigmurus*. A- *T. stigmurus*, jovem do Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí. Foto por L.S. Carvalho. B- *T. kuryi*, fêmea de Mata do Capão, Palmeiras. Foto por T.J. Porto. C- *T. serrulatus*, fêmea de Macará, Bahia. Foto por L.S. Carvalho. D- *T. martinpaechi*, fêmea do Parque Nacional Ubajara, Ceará. Foto por L.S. Carvalho. E- *T. aba*, fêmea de Floresta Nacional Contendas do Sincorá, BA; F- *T. melici*, macho do Parque Estadual de Grão Mogol, Minas Gerais 57

Figura 2.3: A- Distribuição geográfica de espécimes de *Tityus aba*, *T. kuryi* e *T. melici* amostrados para análises moleculares neste trabalho. B- Distribuição geográfica de *T. aba*. C- Distribuição geográfica de *T. kuryi*. D- Distribuição geográfica de *T. melici*. B, C e D: modificados (Almeida 2010).....58

Figura 2.4: A- Distribuição geográfica de espécimes de *Tityus martinpaechi*, *T. serrulatus* e *T. stigmurus* amostrados para análises moleculares neste trabalho. B- Distribuição geográfica de *T. martinpaechi*. C- Distribuição geográfica de *T. serrulatus*. D- Distribuição geográfica de *T. stigmurus*. B, C e D: modificados (Almeida 2010)...59

- Figura 2.5:** Espécime vivo de *Tityus aba*, fotografado em Contendas do Sincorá (Bahia), sob luz branca (esquerda) e sob luz ultravioleta (direita)..... 60
- Figura 2.6:** Fêmea (esquerda) e macho (direita) de *Tityus cf. serrulatus* coletados em Contendas do Sincorá (Bahia) 60
- Figura 2.7:** Árvore simplificada de Máxima Verossimilhança (A) e Inferência Bayesiana (B) para o gene mitocondrial COI. Números nos ramos representam valores de *bootstrap* e probabilidade posterior, respectivamente. Valores à direita representam o número de indivíduos de cada espécie presentes em politomia ou ramo colapsado.....67
- Figura 2.8:** Árvore simplificada de Máxima Verossimilhança (A) e Inferência Bayesiana (B) para o gene mitocondrial 16S. Números nos ramos representam valores de *bootstrap* e probabilidade posterior, respectivamente. Valores à direita representam o número de indivíduos de cada espécie presentes em politomia ou ramo colapsado. . . 6 8
- Figura 2.9:** Árvore simplificada de Máxima Verossimilhança (A) e Inferência Bayesiana (B) para o gene nuclear ITS. Números nos ramos representam valores de *bootstrap* e probabilidade posterior, respectivamente. Valores à direita representam o número de indivíduos de cada espécie presentes em politomia ou ramo colapsado. . . 6 9
- Figura 2.10:** Árvore simplificada de Máxima Verossimilhança (A) e Inferência Bayesiana (B) para os genes mitocondriais COI e 16S concatenados. Números nos ramos representam valores de *bootstrap* e probabilidade posterior, respectivamente. Valores à direita representam o número de indivíduos de cada espécie presentes em politomia ou ramo colapsado..... 72
- Figura 2.11:** Árvore simplificada de Máxima Verossimilhança (A) e Inferência Bayesiana (B) para os genes mitocondriais COI e 16S e o gene nuclear ITS concatenados. Números nos ramos representam valores de *bootstrap* e probabilidade posterior, respectivamente. Valores à direita representam o número de indivíduos de cada espécie presentes em politomia ou ramo colapsado 74
- Figura 2.12:** Árvores dos genes mitocondrial COI (A), mitocondrial 16S (B) e nuclear ITS2 (C) contidos na árvore de espécie. *Tityus stigmurus* engloba *T. aba*, *T. martinpaechi* e *T. serrulatus*. Valores nos nós representam a probabilidade posterior do clado.71
- Figura 2.13:** Grânulos espiniformes em metassoma de representantes do complexo *Tityus stigmurus*. A- *T. melici*, macho UFMG15120. B- *T. melici*, modificado de Lourenço 2003. C- *T. serrulatus* partenogenético, fêmea UFMG12039. D- *T. serrulatus*, modificado de Lourenço 2001. E- *T. serrulatus* sexuado, fêmea UFMG5357 F- *T. cf. serrulatus*, fêmea UFMG17556. G- *T. martinpaechi* modificado de Lourenço 2003. H- *T. aba*, modificado de Candido *et al.* 2005. Setas apontam para os grânulos..... 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Genes usados nesse trabalho, bem como o nome dos iniciadores de cada gene, sua sequência nucleotídica e os autores correspondentes	31
Tabela 2.1: Genes usados nesse trabalho, bem como o nome dos iniciadores de cada gene, sua sequência nucleotídica e os autores correspondentes	61
Tabela 2.2: Hipóteses de limites de espécies testadas nesse trabalho	64
Tabela 2.3: Modelos de evolução de nucleotídeos para cada gene e para cada conjunto de dados concatenados	65
Tabela 2.4: Hipóteses comparadas por AICM. Valores mais baixos de AICM indicam melhor ajuste da hipótese	71

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Lista dos espécimes de escorpiões utilizados para detecção de <i>Wolbachia</i> . Números com asterisco indicam espécimes cujo tecido reprodutor foi utilizado para extração de DNA.	90
Anexo 2: Lista de espécies que atualmente compõe o complexo <i>Tityus stigmurus</i> , com principais características morfológicas e distribuição geográfica de cada espécie. . .	9 2
Anexo 3: Lista dos espécimes utilizados nas análises moleculares, com respectivas localidades, coordenadas geográficas e genes seqüenciados	94
Anexo 4: Número de indivíduos de cada espécie do complexo <i>Tityus stigmurus</i> e grupo externo seqüenciados para os genes COI, 16S e ITS	103
Anexo 5: Comprimento total dos genes COI, 16S e ITS em pares de bases, número de sítios variáveis e invariáveis e suas respectivas porcentagens e quantidade de inserções e deleções em cada marcador. Primeiro, os valores são dados comparando-se somente espécimes do complexo <i>T. stigmurus</i> e, em sequência, comparando-se os exemplares desse complexo e o grupo externo	103
Anexo 6: Árvore de Máxima Verossimilhança (A) e Inferência Bayesiana (B) para o gene mitocondrial COI. Números nos ramos representam valores de <i>bootstrap</i> e probabilidade posterior, respectivamente	104
Anexo 7: Árvore de Máxima Verossimilhança (A) e Inferência Bayesiana (B) para o gene mitocondrial 16S. Números nos ramos representam valores de <i>bootstrap</i> e probabilidade posterior, respectivamente	106

Anexo 8: Árvore de Máxima Verossimilhança (A) e Inferência Bayesiana (B) para o gene nuclear ITS2. Números nos ramos representam valores de <i>bootstrap</i> e probabilidade posterior, respectivamente	108
Anexo 9: Árvore de Máxima Verossimilhança (A) e Inferência Bayesiana (B) para os genes mitocondriais COI e 16S concatenados. Números nos ramos representam valores de <i>bootstrap</i> e probabilidade posterior, respectivamente	110
Anexo 10: Árvore de Máxima Verossimilhança (A) e Inferência Bayesiana (B) para os genes mitocondriais COI e 16S e o gene nuclear ITS concatenados. Números nos ramos representam valores de <i>bootstrap</i> e probabilidade posterior, respectivamente	112
Anexo 11: Árvore do gene mitocondrial COI contido na árvore de espécies. Valores nos nós representam a probabilidade posterior do clado.	114
Anexo 12: Árvore do gene mitocondrial 16S contido na árvore de espécies. Valores nos nós representam a probabilidade posterior do clado.	115
Anexo 13: Árvore do gene nuclear ITS2 contido na árvore de espécies. Valores nos nós representam a probabilidade posterior do clado	115
Anexo 14: <i>Tityus kuryi</i> . Fêmea UFMG17555 em visão dorsal (A) e em visão ventral (B). Macho UFMG17554 em visão dorsal (C) e em visão ventral (D).....	116
Anexo 15: Macho (acima) de <i>T. aba</i> sem manchas nas pernas e pedipalpos. Fêmea (abaixo) da mesma espécie com manchas nas pernas e pedipalpos	117
Anexo 16: <i>Tityus stigmurus</i> : Fêmea UFMG12032 em visão dorsal (A) e em visão ventral (B). Macho UFMG12033 em visão dorsal (C) e em visão ventral (D).....	118
Anexo 17: <i>Tityus martinpaechi</i> : Fêmea UFMG17558 em visão dorsal (A) e em visão ventral (B). Macho UFMG17557 em visão dorsal (C) e em visão ventral (D).....	119
Anexo 18: <i>Tityus cf. serrulatus</i> : Fêmea UFMG17556 em visão dorsal (A) e em visão ventral (B). Macho IBSP6818 em visão dorsal (C) e em visão ventral (D).....	120
Anexo 19: <i>Tityus aba</i> : Fêmea IBSP6842 em visão dorsal (A) e em visão ventral (B). Macho MZSP28196 em visão dorsal (C) e em visão ventral (D).....	121
Anexo 20: <i>Tityus melici</i> : Fêmea UFMG15121 em visão dorsal (A) e em visão ventral (B). Macho UFMG15120 em visão dorsal (C) e em visão ventral (D).	122
Anexo 21: <i>Tityus serrulatus</i> Ita: Fêmea UFMG11156 em visão dorsal (A) e em visão ventral (B). Macho UFMG7476 em visão dorsal (C) e em visão ventral (D). <i>T. serrulatus</i> partenogenético: Fêmea UFMG12039 em visão dorsal (E) e em visão ventral (F).....	123

SUMÁRIO

Introdução Geral.....	16
Referências Bibliográficas.....	19

CAPÍTULO I: A partenogênese do escorpião amarelo (*Tityus serrulatus*) está relacionada a bactérias endossimbiontes (*Wolbachia* sp.)?

Resumo.....	23
Abstract.....	24
Introdução	25
Material e Métodos.....	27
Resultados.....	33
Discussão	34
Referências Bibliográficas.....	40

CAPÍTULO II: Delimitação de espécies de escorpiões do complexo *Tityus stigmurus* (Buthidae)

Resumo.....	48
Abstract.....	49
Introdução.....	50
Material e Métodos.....	55
Resultados.....	65
Discussão	75
Referências Bibliográficas.....	83

ANEXOS.....	90
-------------	----

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Tityus* Koch, 1836, um dos principais causadores de acidentes com animais peçonhentos na América Latina (Chippaux & Goyffon 2008), apresenta cerca de 200 espécies descritas (Rein 2010) de escorpiões de 25 a 110 mm de comprimento. A coloração das espécies do gênero pode apresentar quase todos os padrões observados entre escorpiões em geral, variando desde amarelado até animais muito escuros, com todos os segmentos fortemente granulados (Lourenço 2002). Atualmente, o gênero *Tityus* é dividido em cinco subgêneros, e o subgênero *Tityus* inclui dois complexos de espécies: o complexo *T. confluens* (*sensu* Lourenço & Silva 2006) e o complexo *T. stigmurus* (*sensu* Lourenço 1981, 2001).

O complexo *T. stigmurus* contém seis espécies: *T. aba* Candido 2005, *T. kuryi* Lourenço 1997, *T. martinpaechi* Lourenço 2001, *T. melici* Lourenço 2003, *T. serrulatus* Lutz & Mello 1922 e *T. stigmurus* Thorell 1876 (Souza *et al.* 2009). Os escorpiões deste grupo estão distribuídos entre o nordeste e o sudeste do Brasil e são facilmente reconhecíveis entre si por caracteres como coloração e granulação do tegumento (Souza *et al.* 2009). Entretanto, os limites entre as espécies são controversos. Lourenço & Cloudsley-Thompson (1999) e Lourenço (2002) propõem que *T. serrulatus*, *T. lamottei* e *T. martinpaechi* seriam apenas variantes geográficas, reprodutivas e de coloração, de *T. stigmurus*. Estas conclusões foram desafiadas recentemente por uma revisão taxonômica do grupo (Souza *et al.* 2009), em que são descritas em detalhes todas as espécies do complexo, incluindo o macho, até então desconhecido, de *T. serrulatus*, além de considerar *T. lamottei* como sinônimo júnior de *T. serrulatus*.

T. stigmurus e *T. serrulatus* são considerados escorpiões de importância médica e ocorrem em uma imensa área geográfica do Brasil, representando um importante problema de saúde pública, com registros de acidentes fatais em humanos (Freire-Maia *et al.* 1994). Além de sua relevância clínica, o veneno de escorpiões é conhecido por conter uma mistura complexa de componentes biologicamente ativos (Possani *et al.* 1999), que podem ser utilizados com fins biotecnológicos. Entretanto, as dificuldades de delimitação de espécies nesse gênero apresentam um impedimento para esses estudos. Uma vez que as toxinas dos artrópodes são em geral espécie-específicas em sua composição, é plausível supor que o veneno de uma espécie de escorpião não necessariamente sirva para reproduzir antídotos para o veneno de outras espécies e não possua as mesmas finalidades biotecnológicas. Uma vez que características

morfológicas não são suficientes para delimitar as espécies do grupo, Lourenço e Cloudsley-Thompson (1996) afirmam que para definir melhor as relações filogenéticas entre *T. serrulatus* e *T. stigmurus* é necessário trabalhos a nível molecular e por isso a delimitação de espécies utilizando genes torna-se uma ferramenta essencial para entender a evolução do complexo *T. stigmurus*.

Os escorpiões do complexo *Tityus stigmurus* são também conhecidos por apresentar espécies partenogénicas. Este fenómeno foi descrito pela primeira para *T. serrulatus* por Matthiesen (1962) e, posteriormente, para *T. stigmurus* por Ross (2010). A partenogénese é uma forma de reprodução assexuada que evoluiu independentemente em várias linhagens de animais, através de vários mecanismos diferentes (Simon *et al.* 2003). Uma das causas mais frequentes da ocorrência de partenogénese em animais é a indução por ação de bactérias endossimbiontes, principalmente do género *Wolbachia* (Schön *et al.* 2009, Stouthamer *et al.* 1999). *Wolbachia* é um género de bactérias intracelulares obrigatórias que infectam aproximadamente 66% das espécies de insetos (Hilgenboecker *et al.* 2008), e ocorre também em nematódeos, crustáceos e aracnídeos (Sironi *et al.* 1995, Courdaux *et al.* 2001, Rowley *et al.* 2004). Artrópodes infectados por esse microrganismo podem ter o sistema reprodutivo seriamente perturbado através de, por exemplo, indução de partenogénese, morte seletiva de embriões machos e feminização de machos genéticos (Werren *et al.* 1997). Bactérias desse género foram recentemente detectadas em escorpiões (Baldo *et al.* 2007), entre eles *T. serrulatus* (Suesdek- Rocha *et al.* 2007). A presença desta bactéria pode ter importantes implicações para estudos de filogeografia e delimitação de espécies com base em dados moleculares, uma vez que a infeccção por *Wolbachia* pode provocar mudanças na genética mitocondrial do hospedeiro infectado, a partir da modificação da frequência alélica de determinados genes (Turelli *et al.* 1992), o que influencia análises que utilizam marcadores mitocondriais (Jiggins 2003) . Supõe-se que forças seletivas que atuam em parasitas intracelulares em equilíbrio de ligação com mitocôndrias também atuem nessas organelas. Com isso, cepas de bactérias do género *Wolbachia* sofreriam deriva em diferentes populações de seu hospedeiro, agindo assim como um marcador molecular em processo de coevolução com o mesmo. Espera-se que o conhecimento da filogeografia de cepas de *Wolbachia* possa ser usado futuramente para a produção de ferramentas moleculares no estudo da genética de populações de escorpiões contaminados com esse microrganismo.

Esta dissertação está dividida em dois capítulos. No primeiro capítulo empreguei o uso de dois marcadores específicos de *Wolbachia*, com o objetivo de confirmar a presença dessa bactéria em populações partenogenéticas de *T. serrulatus*. No segundo capítulo utilizei três marcadores, dois mitocondriais e um nuclear, a fim de propor e testar hipóteses de limites entre as espécies do complexo *T. stigmurus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baldo L., Prendini L., Corthals A., Werren J. (2007) ***Wolbachia* are present in southern African scorpions and cluster with supergroup F.** *Current Microbiology* 55: 367-373
- Chippaux J.P., Goyffon M. (2008) **Epidemiology of scorpionism: A global appraisal.** *Acta Tropica* 107: 71-79
- 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
- Freire-Maia L., Campos J.A., Amaral C.F.S. (1994) **Approaches to the treatment of scorpion envenoming.** *Toxicon* 32: 1009-1014
- Hilgenboecker K., Hammerstein P., Schlattmann P., Telschow A., & Werren J. H. (2008). **How many species are infected with *Wolbachia*? – a statistical analysis of current data.** *Fems Microbiology Letters* 281(2) 215–220
- Jiggins F.M. (2003) **Male-killing *Wolbachia* and mitochondrial DNA: selective sweeps, hybrid introgression and parasite population dynamics.** *Genetics* 164 (1): 5-12
- Lourenço W.R. (1981) **Sur la systématique des scorpions appartenant au complexe *Tityus stigmurus* (Thorell, 1877) (Buthidae).** *Revista Brasileira de Biologia* 41: 351–362
- Lourenço W.R. (2001) **The Brazilian scorpion *Tityus stigmurus* (Chelicerata, Buthidae) and its complex of morphos. A new model is needed.** *Biogeographica* 77(1): 21-34
- Lourenço W.R. (2002) **Scorpions of Brazil.** Les Éditions de l’If, Paris
- Lourenço W.R., da Silva E.A. (2006) **A reappraisal of the geographical distribution of the complex *Tityus confluens* Borelli, 1899 (Scorpiones, Buthidae) with the description of a new species.** *Entomologische Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum Hamburg* 14(174): 307-320

- Lourenço W.R., Cloudsley-Thompson J.L. (1996) **Effects of human activities on the environment and on the distribution of dangerous species of scorpions. *Envenomings and their Treatments*** Editions Fondations Marcel, Lyon. Pp. 49-60
- Lourenço W.R., Cloudsley-Thompson J.L. (1999) **Discovery of a sexual population of *Tityus serrulatus*, one of the morphs within the complex *Tityus stigmurus* (Scorpiones, Buthidae).** *Journal of Arachnology* 27: 154–158
- Matthiensen F.A. (1962) **Parthenogenesis in scorpions.** *Evolution* 16 (2): 255-256
- Possani L.D., Becerril B., Delepierre M., Tytgat. J. (1999) **Scorpion toxins specific for Na⁺ channels.** *European Journal of Biochemistry* 264: 287-300
- Ross L.K. (2010) **Confirmation of parthenogenesis in the medically significant, synanthropic scorpion "*Tityrus sigmurus*" (Thorell, 1876) (Scorpiones: Buthidaes)** *Revista Ibérica de Aracnología* 18: 115-121
- Rowley S.M., Raven R.J., McGraw E.A. (2004) ***Wolbachia pipientis* in Australian Spiders.** *Current Microbiology* 49: 208-214
- Schön I., Martens K., Van Dijk P. (Eds.) (2009) **Lost sex. The Evolutionary Biology of Parthenogenesis.** Springer, Dordrecht
- Simon J.C., Delmotte F., Risper C., Crease T. (2003) **Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: the possible routes to parthenogenesis in animals.** *Biological Journal of the Linnean Society* 79(1): 151-163
- Sironi M., Bandi C., Sacchi L., Di Sacco B., Damiani G., Genchi C. (1995) **Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm.** *Molecular Biochemistry Parasitology* 74: 223-227
- Stouthamer R., Breeuwer J.A.J., Hurst G.D.D. (1999) ***Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator of arthropod reproduction.** *Annual review microbiology* 53: 71–102

- Souza C.A.R., Candido D.M., Lucas S.M., Brescovit A.D. (2009) **On the *Tityus stigmurus* complex (Scorpiones, Buthidae).** *Zootaxa* 1987: 1–38
- Suesdek-Rocha L., Bertani R., Silva-Junior P.I., Selivon D. **The first record for *Wolbachia* in a scorpion: the parthenogenetic yellow scorpion *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae).** *Revista Ibérica de Aracnologia* 2007: 183-184
- Turelli M., Hoffmann A.A., McKechnie, S.W. (1992) **Dynamics of cytoplasmic incompatibility and mtDNA variation in natural *Drosophila simulans* populations.** *Genetics* 132: 713–723
- Werren J.H. (1997) **Biology of *Wolbachia*.** *Annual Review of Entomology* 42: 587-609

CAPÍTULO I

A partenogênese do escorpião amarelo (*Tityus serrulatus*) está relacionada a bactérias endossimbiontes (*Wolbachia* sp.)?

RESUMO

O escorpião amarelo *Tityus serrulatus* é uma espécie de importância médica amplamente distribuída no Brasil. Sua reprodução se dá principalmente por partenogênese, sendo conhecidas poucas populações com reprodução sexuada. Recentemente foi relatada a presença em uma população de *T. serrulatus* de bactérias do gênero *Wolbachia*, um grupo de simbioses endocelulares, conhecidos por induzir reprodução assexuada em vários grupos de artrópodes. Assim, este achado sugeriria que a partenogênese nesta espécie de escorpiões seria provocada pela ação dessas bactérias. Esta descoberta teria implicações também para estudos de filogeografia e genética de populações de *T. serrulatus*, já que a presença desse microrganismo poderia estar em desequilíbrio de ligação com o DNA mitocondrial do escorpião, influenciando frequência gênica de diferentes marcadores mitocondriais. Neste estudo, investiguei a presença de *Wolbachia* em diferentes populações de *T. serrulatus*, incluindo populações sexuadas, através de testes de amplificação por PCR de dois genes bacterianos, WSP e ftsZ. Extraí DNA de músculos das pernas de 40 espécimes de escorpiões provenientes de 17 localidades; e de tecidos reprodutivos de oito espécimes de quatro localidades. Também analisei as outras cinco espécies do complexo *T. stigmurus*, que inclui *T. serrulatus*. Os testes de amplificação incluíram como controle positivo o DNA extraído de moscas do gênero *Drosophila* contaminadas com *Wolbachia*. Os resultados foram negativos para todos os testes com DNA de escorpiões, mas positivo para o DNA de *Drosophila*. O DNA genômico extraído dos escorpiões foi amplificado com sucesso utilizando iniciadores para o gene mitocondrial COI, o que permite descartar a possibilidade de degradação do material genômico nos espécimes testados. Sequenciei o material amplificado de *Drosophila*, que mostrou-se compatível com seqüências de *Wolbachia* depositadas no GenBank. Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que a infecção por *Wolbachia* relatada previamente para esta espécie seria restrita a apenas uma população analisada, ou que os resultados obtidos previamente seriam relacionados a contaminação de amostras. Dessa forma, não se pode afirmar que o surgimento da partenogênese em *T. serrulatus* está associado à presença de *Wolbachia*. Além disso, futuros estudos utilizando marcadores mitocondriais podem ser realizados sem a preocupação de que haplótipos mitocondriais tenham sofrido varredura seletiva por esse microrganismo.

ABSTRACT

The yellow scorpion *Tityus serrulatus* is medically important species widely distributed in Brazil. Its reproduction mainly occurs by parthenogenesis, and sexual reproduction is known for only a few populations. Recently, the bacteria of the genus *Wolbachia*, a group of intracellular symbionts known to induce asexual reproduction in many groups of arthropods, was reported in a population of *T. serrulatus*. This finding suggests that the parthenogenesis in this scorpion could be caused by the action of these bacteria. This discovery could also have implications for phylogeography and population genetics studies on this species, since the presence of this microorganism could be in linkage disequilibrium with the mitochondrial DNA of the scorpion, influencing gene frequency of mitochondrial markers. In this study, I investigated the presence of *Wolbachia* in different populations of *T. serrulatus*, including sexual populations, through PCR amplification tests of two bacterial genes, WSP and ftsZ. I extracted DNA from leg muscles of 40 specimens of *T. serrulatus* from 17 locations; and reproductive tissues of eight specimens from four locations. I also analyzed the five other species of the *T. stigmurus* complex, which includes *T. serrulatus*. Amplification tests included as positive control DNA extracted from flies of the genus *Drosophila* infected with *Wolbachia*. The results were negative for all tests with scorpion DNA, but positive for *Drosophila* DNA. The same genomic DNA extracted from scorpions was successfully amplified using primers for the mitochondrial gene COI, allowing us to discard the possibility of genomic material degradation in the specimens sampled. I sequenced the amplified *Drosophila* DNA, which was compatible with the *Wolbachia* sequences deposited in GenBank. The results of this study suggest that the *Wolbachia* infection previously reported for this species would be restricted to just the single population analyzed, or that the results previously obtained could be related to sample contamination. Thus, the emergence of parthenogenesis in *T. serrulatus* can not be associated with the presence of *Wolbachia*. In addition, future studies using mitochondrial markers can be performed on this scorpion, without concerns that mitochondrial haplotypes have suffered selective sweep by this microorganism.

INTRODUÇÃO

Partenogênese é a forma de reprodução no qual embriões se desenvolvem sem haver a fertilização do gameta feminino. Este é um fenômeno raro em aracnídeos, reportado poucas espécies de ácaros, opiliões (Lourenço & Cuellar 1994), aranhas (Edwards *et al.* 2003) e em algumas espécies de escorpiões que se reproduzem principalmente por partenogênese telítoca, em que a prole é constituída somente por fêmeas (Lourenço 2008). De aproximadamente 1750 espécies de escorpiões descritas no mundo (Kovařík 2011), a partenogênese foi demonstrada ou sugerida para apenas 14 (Francke 2008), entre elas o escorpião amarelo *Tityus serrulatus* (Matthiensen 1971) e, como confirmado posteriormente (Ross 2010), *T. stigmurus*, ambas espécies de importância médica.

Animais que se reproduzem assexuadamente tem maiores chances de colonizar ambientes perturbados, uma vez que a reprodução pode ocorrer sem a presença de um membro do sexo oposto (Cuellar 1977, Lourenço 2008). Nos últimos anos, a distribuição geográfica de *T. serrulatus* aumentou consideravelmente (Lourenço 2001). Acreditava-se que essa espécie era restrita a uma única cidade brasileira, Belo Horizonte, Minas Gerais (Bortoluzzi *et al.* 2007), local onde o holótipo foi encontrado. Porém, hoje há registros de *T. serrulatus* em 16 Estados do Brasil (Bortoluzzi *et al.* 2007, Souza *et al.* 2009). Aliado a sua facilidade em colonizar ambientes perturbados por ação antrópica (Lourenço 2008), cada fêmea de *T. serrulatus* pode ter três, quatro ou mais parições e cerca de 70 filhotes durante a vida (Matthiensen 1971). Esses fatores fazem com que essa espécie, cujo veneno tem alta toxicidade em humanos, seja um excepcional problema de saúde pública no Brasil (Lourenço 2001). Embora as causas da partenogênese em *T. serrulatus* sejam desconhecidas, evidências recentes (Suesdek-Rocha *et al.* 2007) sugerem que, pelo menos em uma população, esta foi induzida por microorganismos simbiotes.

Bactérias intracelulares do gênero *Wolbachia*, pertencentes ao grupo das α -proteobactérias, são conhecidas por induzir incompatibilidade citoplasmática, distorção na proporção sexual, feminização de machos genéticos, morte de machos e partenogênese (O'Neill *et al.* 1997). A principal forma de proliferação desse microrganismo é a transmissão vertical (Hoffman *et al.* 1990) e, por ser transmitida por herança materna, a bactéria induz o aumento de fêmeas em populações parasitadas

(Werren 1997, Koivisto & Braig 2003). Porém, a transmissão horizontal entre diferentes táxons também pode ocorrer, como, por exemplo, através de relações de parasitismo e predação (Werren 1997). *Wolbachia* está presente em uma ampla gama de hospedeiros, tendo sido relatada em nematódeos (Sironi *et al.* 1995) e em diversos artrópodes, incluindo crustáceos (Juchault *et al.* 1994, Courdaux *et al.* 2001, Maniatsi *et al.* 2010), insetos (Werren & Windsor 2000, Werren *et al.* 1995) e quelicerados (Johanowicz 1995, Rowley 2004, Zeh *et al.* 2005). Em relação à taxonomia, essas bactérias podem ser divididas em oito linhagens denominadas de A a H (Casiraghi *et al.* 2005). As linhagens nomeadas por C e D são encontradas apenas em nematódeos (Bazzochi *et al.* 2000).

A infecção por *Wolbachia* tem implicações em processos evolutivos importantes, devido aos efeitos que pode causar no organismo contaminado (Werren 1997). Entre esses efeitos, essa bactéria pode interferir em processos genéticos, provocando mudanças na genética populacional do DNA mitocondrial do hospedeiro, se ambos forem transmitidos juntamente e, portanto, em desequilíbrio de ligação (Turelli *et al.* 1992). Desequilíbrio de ligação é a associação não aleatória entre alelos de diferentes locos numa população, o que gera desvio das frequências alélicas em relação às frequências esperadas sob independência (Rosa 2011). Com isso, a presença da *Wolbachia* pode influenciar resultados de análises filogenéticas, pois padrões de variação do DNA mitocondrial podem refletir a história evolutiva do parasita, e não do hospedeiro (Jiggins 2003). Assim, a presença de *Wolbachia* deve ser checada antes da realização de análises de filogenia e filogeografia baseadas em DNA mitocondrial (Arthofer *et al.* 2010).

Recentemente, *Wolbachia* foi encontrada em gônadas de *Opisththalmus* (Scorpionidae), um gênero de escorpiões sul africanos (Baldo *et al.* 2007) e em glândulas de veneno da espécie iraniana *Hemiscorpius lepturus* (Hemiscorpiidae) (Baradaran *et al.* 2011). Suesdek-Rocha *et al.* (2007) demonstrou, a partir de um fragmento de 16S específico de *Wolbachia*, a presença desse microrganismo em uma população de *T. serrulatus* partenogenético. Esse escorpião está inserido no complexo *Tityus stigmurus*, composto atualmente por seis espécies, em que os limites das mesmas, baseados em dados morfológicos, são contraditórios na literatura. Por isso, a delimitação de espécies do complexo poderia ser resolvida através de análises filogenéticas baseadas em dados moleculares. Assim, tendo em vista os efeitos

potenciais da infecção por *Wolbachia* sobre os padrões de divergência e dispersão de DNA mitocondrial, é essencial confirmar a infecção em *T. serrulatus* e averiguar a mesma em outras populações, assim como compará-las com populações sexuadas.

Meu objetivo nesse capítulo é confirmar, a partir de ferramentas moleculares, a presença de *Wolbachia* em populações partenogenéticas de *T. serrulatus*, em comparação com populações sexuadas e com as demais espécies do complexo *T. stigmurus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de espécimes

Adquiri os espécimes utilizados nesse estudo a partir de coletas e empréstimos de material armazenado em álcool 95-100%, proveniente de coleções taxonômicas (Anexo 1). Realizei coletas diurnas e noturnas, durante os anos de 2010 e 2012, abrangendo regiões de ocorrência das espécies de interesse nos estados de Minas Gerais, Bahia e Piauí. Encontrei os animais em regiões de Floresta Estacional Decídua (mata seca) e Cerrado, além de regiões semi-urbanas. O georreferenciamento dos pontos foi feito com um GPS, no local de coleta. Nas coletas diurnas, procurei os aracnídeos embaixo de pedras e de troncos. Para as coletas noturnas, usei lanterna de luz ultravioleta, uma vez que escorpiões fluorescem quando iluminados sob este comprimento de onda. Armazenei todos os espécimes em álcool 95-100% e mantive-os refrigerados até a extração do tecido para análise molecular. Depositei o material testemunho na coleção de aracnídeos das Coleções Taxonômicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais (UFMG, curador Adalberto J. Santos).

Os espécimes obtidos por empréstimo são provenientes do Instituto Butantan, São Paulo (IBSP, curador Antonio D. Brescovit) e Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo (MZSP, Ricardo Pinto-da-Rocha). Georreferenciei os espécimes que não possuíam coordenadas geográficas com a ferramenta Google Earth™. Posteriormente construí um mapa de distribuição dos espécimes de *T.*

serrulatus usados nesse trabalho através do programa SimpleMappTM (<http://www.simplemappr.net>).

Extração de DNA

Submeti a técnicas de extração de DNA o total de 40 espécimes de *T. serrulatus*, coletados em 17 localidades nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Rio de Janeiro e Santa Catarina. Entre esses indivíduos, analisei duas populações sexuadas (Figura 1.1). Além dos exemplares de *T. serrulatus*, analisei também um indivíduo de cada uma das cinco espécies do complexo *Tityus stigmurus*, distribuídos nos estados da Bahia, Minas Gerais e Piauí, a fim de investigar a presença de *Wolbachia* nessas espécies. Escolhi para esse estudo espécimes que apresentaram previamente sucesso na amplificação e sequenciamento de pelo menos um marcador mitocondrial de escorpião (16S e/ou COI), de modo a descartar a possibilidade de obtenção de resultados negativos devido à degradação do DNA presente nos espécimes. Realizei todas as etapas de extração de DNA de acordo com o protocolo do kit *WizardTM Genomic DNA Purification Kit* (Promega).

Obtenção do controle positivo

Clark *et al.* (2005) comprovou que aproximadamente 30% de moscas do gênero *Drosophila* criadas em laboratório podem estar contaminada com *Wolbachia*. Assim, testei moscas coletas em residência para verificar se a bactéria estava presente, a fim de utilizar o material como controle positivo. Coletei aproximadamente dez indivíduos em uma área residencial e os fixei em álcool 95-100%, mantendo-os refrigerados. Para extração, utilizei o inseto inteiro, exceto o abdômen. Realizei essa etapa macerando as moscas em conjunto e extraíndo seu DNA em um único tubo.

Extração de DNA de músculos e tecidos reprodutivos

Uma vez que alguns trabalhos utilizam tecidos somáticos para detectar *Wolbachia*, como glândulas de veneno em escorpiões (Baradaran *et al.* 2011) e pernas de borboletas (Kodandaramaiah *et al.* 2011) e aranhas (Rowley *et al.* 2004), realizei extração de DNA a partir da musculatura dos escorpiões, removendo duas pernas de cada espécime. Dissequei-as para a remoção dos músculos, macerei-os e os submeti ao processo de extração de DNA. As pernas foram escolhidas para evitar resultados falsos-positivos de *Wolbachia*, possivelmente presente em presas ingeridas pelos escorpiões.

Bactérias endossimbiontes de herança materna podem estar ausentes em tecidos somáticos (Dobson *et al.* 1999, Martin & Goodacre 2009). Por outro lado, *Wolbachia* se transmite principalmente de forma vertical (Hoffman *et al.* 1990), e por isso são encontradas facilmente em tecidos reprodutivos do hospedeiro (Werren 1997). Para eliminar a hipótese de que essa bactéria encontra-se somente nas gônadas dos escorpiões analisados nesse trabalho, removi tecidos reprodutivos de alguns dos espécimes cujo músculo das pernas foi extraído. Analisei ovários e embriões de seis indivíduos distribuídos em três populações partenogênicas, e um ovário e um espermatóforo de dois indivíduos de uma população sexuada.

Extração de DNA de material fresco

Para testar se resultados negativos poderiam ser explicados por degradação do DNA de *Wolbachia*, mesmo em espécimes com DNA mitocondrial conservado, sacrifiquei e fixei um espécime partenogênico por duas horas de congelamento a -20 °C e extraí os tecidos imediatamente após o congelamento. Realizei a extração de DNA de várias partes separadas do corpo deste espécime, incluindo pernas, pedipalpos, metasoma, aguilhão, tecidos reprodutivos e embriões. Macerei cada parte do escorpião e extraí o DNA de cada uma em tubos separados, a fim de investigar a presença da bactéria em todos os tecidos.

Extração de DNA de escorpiões em conjunto com moscas Drosophila

A fim de verificar se existe algum composto em escorpiões que impeça a extração de *Wolbachia* com o kit Wizard™, extraí o DNA de três espécimes de escorpiões, em conjunto com moscas *Drosophila* contaminadas. Piquei as pernas dos escorpiões e macerei os músculos dos mesmos juntamente com moscas sem o abdômen. Misturei o material em um mesmo tubo e realizei a extração de DNA.

Amplificação e sequenciamento do material genômico

A análise prévia para a detecção da qualidade do material genômico dos espécimes utilizados nesse experimento envolveu a amplificação dos genes Citocromo Oxidase I através de um iniciador específico para insetos e RNAr 16S usando um iniciador específico para escorpiões (Tabela 1.1). Para a amplificação do COI, as reações de PCR incluíram desnaturação a 94 °C por cinco minutos, quatro ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 48 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por um minuto; 29 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 52 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por um minuto e última fase de extensão a 72 °C por cinco minutos. Para o 16S, as reações foram compostas de desnaturação inicial a 94 °C por cinco minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 48 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos e fase de extensão final a 72 °C por sete minutos.

Para a detecção de *Wolbachia*, utilizei iniciadores para um gene controlador de ciclo celular (*ftsZ*) e um gene codificador de proteína de membrana (WSP) (Tabela 1.1), comumente utilizados em estudos filogenéticos com esse grupo (Braig *et al.* 1998, Zhou *et al.* 1998) . A reação para os dois genes bacterianos incluiu desnaturação inicial a 94 °C por três minutos, seguido por 35 ciclos com um passo de desnaturação a 94 °C por um minuto, anelamento a 55 °C por um minuto, extensão a 72 °C por dois minutos e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Para avaliar os resultados da amplificação, submeti o material resultante à eletroforese em gel de agarose 1% e corado com GelRed™, usando como controle positivo o material extraído das moscas, juntamente com controle negativo resultante de reações de PCR sem DNA. A fim de verificar se o material amplificado resultante das

moscas consistia, de fato, em sequências de *Wolbachia*, aquele foi sequenciado. Purifiquei os fragmentos amplificados através do protocolo de limpeza com Polietilenoglicol (Polietilenoglicol 20% e NaCl 2,5M) e sequenciei as amostras utilizando o *BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit*, e as purifiquei com acetato de amônio 7,5 M. Sequenciei os genes em ambos os sentidos em um sequenciador automático ABI 3130x Genetic Analyser (Applied Biosystems). Comparei as sequências obtidas com sequências depositadas no GenBank através da ferramenta Blast™ (Basic Local Alignment Search Tool).

Tabela 1.1: Genes usados nesse trabalho, bem como o nome dos iniciadores de cada gene, sua sequência nucleotídica e os autores correspondentes.

Gene	Iniciador	Sequência	Referência
Iniciadores para amplificação genes de <i>Wolbachia</i>			
WSP	WSP81F	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC	Braig <i>et al.</i> 1998
	WSP691R	AAAAATTAAACGCTACTCCA	Zhou <i>et al.</i> 1998
ftsZ	FtsZ-F	TACTGACTGTTGGAGTTGTA ACTAAGCCGT	Jeyaprakash & Hoy, 2000
	FtsZ-R	TGCCAGTTGAAGAACTCTA ACTC	Jeyaprakash & Hoy 2000
Iniciadores para amplificação genes de escorpiões			
COI	C1-J-2183	CAACATTTATTTTGGATTTTTTGG	Simon <i>et al.</i> 1994
	COIKG-R2	GATATTAATCCTAAAAAATGTTGAGG	Tanaka <i>et al.</i> 2001
16S	16SF	CGATTTGAACTCAGATCA	Gantenbein <i>et al.</i> 1999
	16SR	GTGCAAAGGTAGCATAATCA	Gantenbein <i>et al.</i> 1999

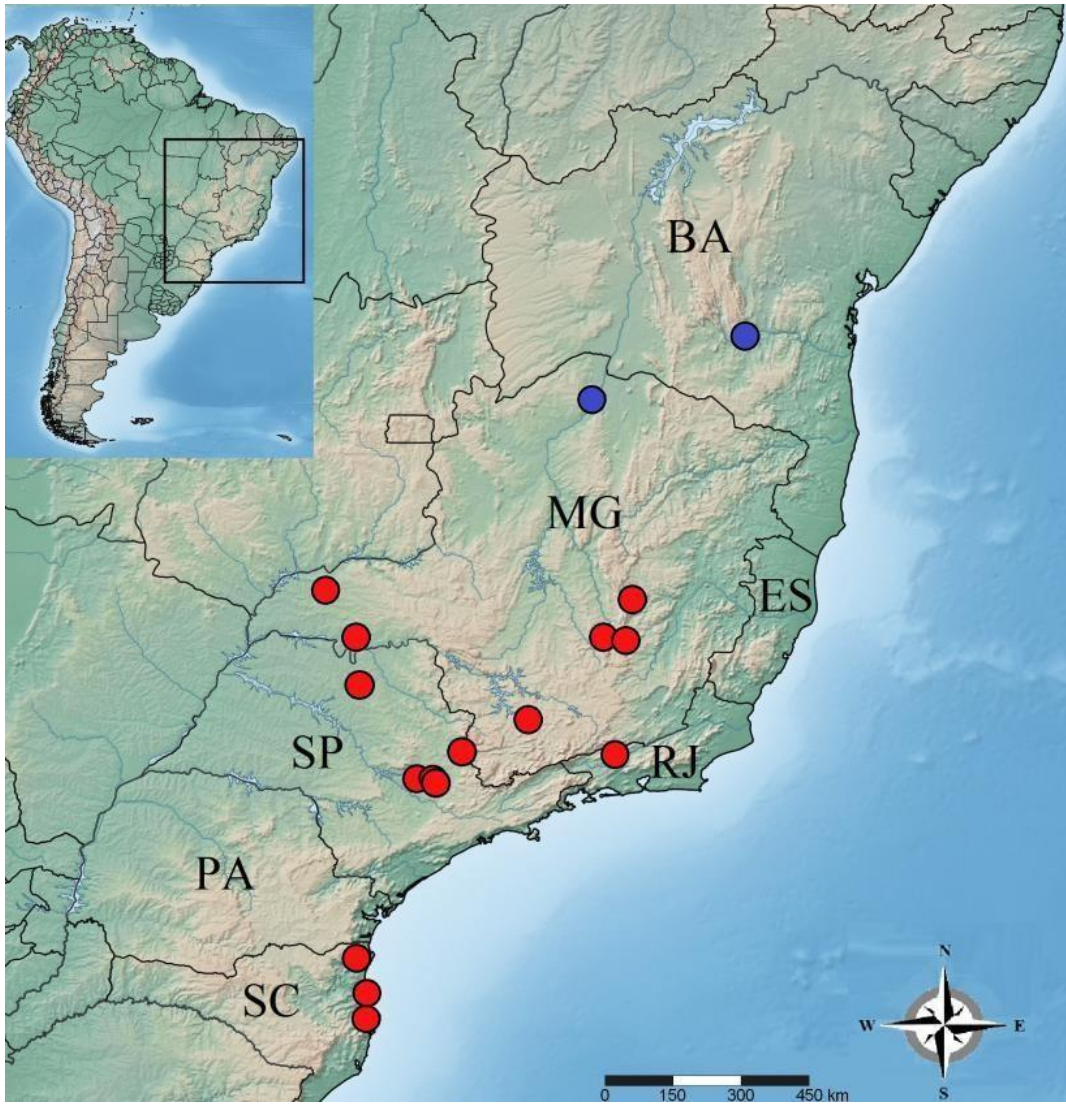


Figura 1.1: Distribuição geográfica de espécimes de *Tityus serrulatus* amostrados neste estudo. Círculos vermelhos representam populações partenogenéticas, círculos azuis populações sexuais.

RESULTADOS

As amostras escolhidas para esse estudo apresentaram pelos menos um gene mitocondrial de escorpião amplificado e sequenciado com sucesso. Isso demonstra que o material analisado está em condições de preservação adequada para a conservação de material genético, especialmente o DNA encontrado fora do núcleo celular (Figura 1.2).

Obtenção do controle positivo

O material resultante da extração de *Drosophila*, utilizado como controle positivo de *Wolbachia*, foi amplificado para os genes WSP e ftsZ em todas as reações na qual foi utilizado. O produto resultante do sequenciamento mostrou-se compatível com sequências de *Wolbachia* depositadas no GenBank (Blast, similaridade = 99% para ftsZ, similaridade = 100% para WSP).

Extração de DNA de músculos e tecidos reprodutivos

Nenhuma amostra proveniente da musculatura de pernas de *Tityus serrulatus*, ou dos demais escorpiões do complexo *T. stigmurus*, apresentou resultado positivo para os genes WSP e ftsZ de *Wolbachia* (Figuras 1.3, 1.4). O mesmo resultado foi obtido para os tecidos reprodutivos, eliminando a possibilidade de a bactéria estar presente no animal, mas se concentrar apenas no sistema reprodutor.

Extração de DNA de material fresco

O material fresco também se apresentou negativo para o teste de *Wolbachia*, indicando que não há degradação de microrganismos durante o armazenamento do espécime, mesmo este sendo conservado em condições adequadas. Esses resultados demonstram também que os resultados negativos descritos acima não se devem a variações de concentração de bactérias em diferentes tecidos dos escorpiões.

Extração de DNA de escorpiões em conjunto com moscas Drosophila

As amostras de tecido muscular de escorpiões, maceradas em conjunto com moscas drosófilas contaminadas, foram positivas para WSP e ftsZ, sendo um indício de que não há compostos nos escorpiões que inibam a extração pelo kit Wizard™ (Figura 1.5).

DISCUSSÃO

Embora os resultados de Suesdek-Rocha *et al.* (2007) tenham sido positivos para *Wolbachia* em *T. serrulatus*, no presente trabalho todos os experimentos apresentaram-se negativos. Os resultados dessa dissertação são baseados em um desenho experimental mais complexo, envolvendo todos os tecidos presentes no corpo do escorpião, um exemplar extraído imediatamente após a fixação e animais desde o período embrionário até a fase adulta. O método de extração de DNA, apesar de diferente do método utilizado por Suesdek-Rocha *et al.* (2007), apresentou-se eficiente para a extração de *Wolbachia* mesmo a bactéria estando presente em compostos originados de escorpiões. Além disso, um número muito maior de localidades foi testado. Suesdek-Rocha *et al.* (2007) utilizou 10 indivíduos (três adultos e sete jovens) de apenas uma localidade, São José do Rio Pardo, São Paulo. Analisei uma população relativamente próxima dessa localidade, Espírito Santo do Pinhal, situada a aproximadamente 68,34 quilômetros de distância (cálculo estimado através do site <http://br.distanciadades.com>). Por não possuir indivíduos de São José do Rio Pardo através de coletas ou empréstimos, seria sensato analisar os indivíduos no qual os primeiros experimentos foram feitos. Porém, os números de tombo dos espécimes não foram indicados na publicação, e, ao procurar o material testemunho na coleção onde os espécimes contaminados foram depositados (Instituto Butantan, São Paulo), há indicativa de que os mesmos foram perdidos (A.D. Brescovit, comunicação pessoal).

Apesar da ampla distribuição do escorpião amarelo no território brasileiro, são registradas populações sexuadas de *T. serrulatus* apenas em Januária, norte de Minas Gerais (Souza *et al.* 2009) e São Desidério, oeste da Bahia (Santos *et al.* 2014). É possível que uma terceira população esteja presente em Contendas do Sincorá, sul da Bahia. Essa população apresenta características morfológicas semelhantes a *T.*

serrulatus, porém é próxima geneticamente a *Tityus aba*, outra espécie do complexo *T. stigmurus* (Capítulo II desta dissertação). Considerando a distribuição das populações sexuadas, partenogênese no escorpião amarelo pode ter surgido entre essas regiões, a partir de organismos sexuados. Indivíduos contaminados por *Wolbachia* em São Paulo podem conter resquícios de contaminações que ocorreram em outras populações no passado, mas que foram revertidas ao longo do tempo, permanecendo apenas o efeito causado pela bactéria. Entretanto, estudos demonstram que populações partenogenéticas tratadas com antibióticos deixam de realizar a reprodução assexuada (Stouthamer & Werren 1993, Legner 1985, Stouthamer & Luck 1991). Isso indica que é necessária a presença da bactéria para que essa forma de reprodução ocorra, o que leva a acreditar que a infecção encontrada por Suesdek-Rocha *et al.* (2007) seja recente e a partenogênese em *T. serrulatus* seja induzida por outros fatores.

Wolbachia pode invadir rapidamente uma população constituída por indivíduos não infectados, em espécies onde a bactéria causa incompatibilidade citoplasmática (Weeks *et al.* 2002). Se o mesmo fenômeno ocorrer em hospedeiros onde o mecanismo induzido pela bactéria é a partenogênese, e considerando a rápida expansão geográfica de *T. serrulatus*, a contaminação presente em escorpiões de São José do Rio Pardo pode se espalhar para outras localidades. Em alguns artrópodes, como em *Drosophila melanogaster*, *Wolbachia* induz resistência a alguns tipos de patógenos virais (Teixeira *et al.* 2008). É possível que o mesmo efeito ocorra em escorpiões. As consequências evolutivas da partenogênese podem envolver linhagens com baixa diversidade genotípica e, com isso, menor capacidade para escapar de parasitas (Hurst & Peck 1996). Com isso, o aumento de populações contaminadas do escorpião amarelo levaria ao aumento da resistência desses animais, agravando-se o problema de saúde pública gerado por esses aracnídeos. Por outro lado, se *T. serrulatus* for alvo de infecções por *Wolbachia*, essa bactéria pode ser usada como ferramenta de controle do crescimento populacional do escorpião. Estratégias experimentais podem ser propostas, explorando o mecanismo de ação baseado em incompatibilidade citoplasmática gerado pela bactéria (Baradaran *et al.* 2011)

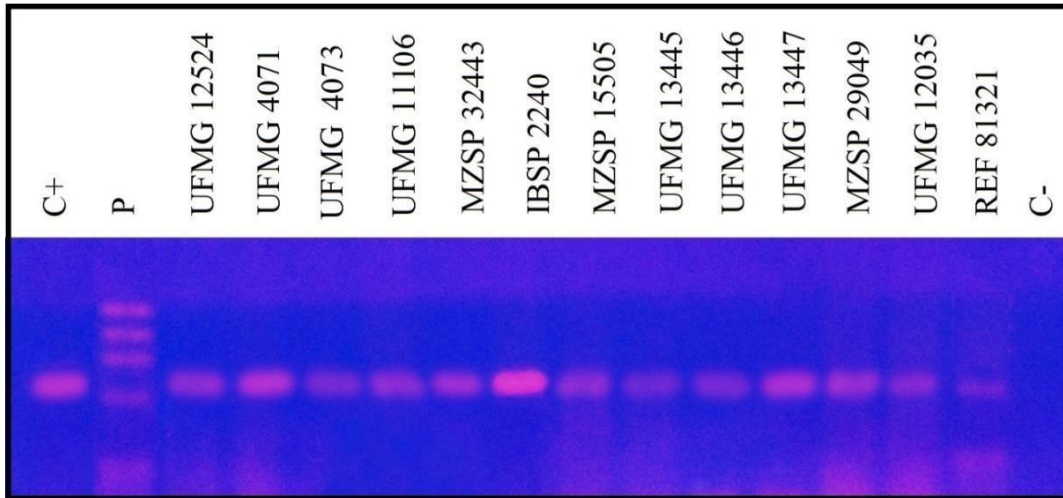


Figura 1.2: Gel de agarose apresentando bandas positivas para Citocromo Oxidase I de *Tityus serrulatus*. As amostras UFMG 12524 e UFMG 11106 pertencem a populações sexuadas; as demais pertencem a populações partenogênicas.

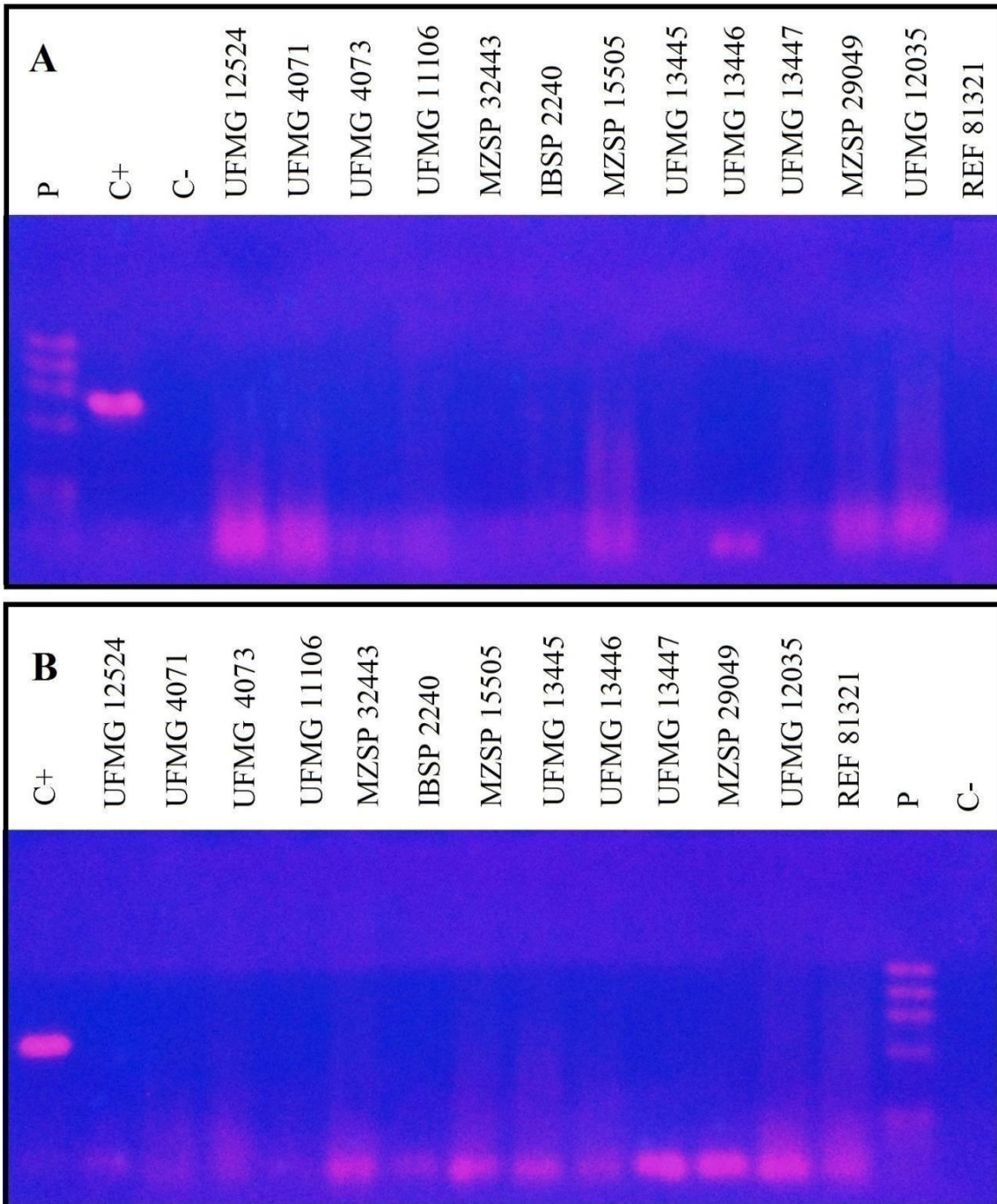


Figura 1.3: Gel de agarose apresentando bandas negativas para os marcadores WSP (A) e ftsZ (B), específicos para *Wolbachia*. Todos os exemplares são *T. serrulatus*. As amostras UFMG 12524 e UFMG 11106 pertencem a populações sexuadas; as demais pertencem a populações partenogenéticas.

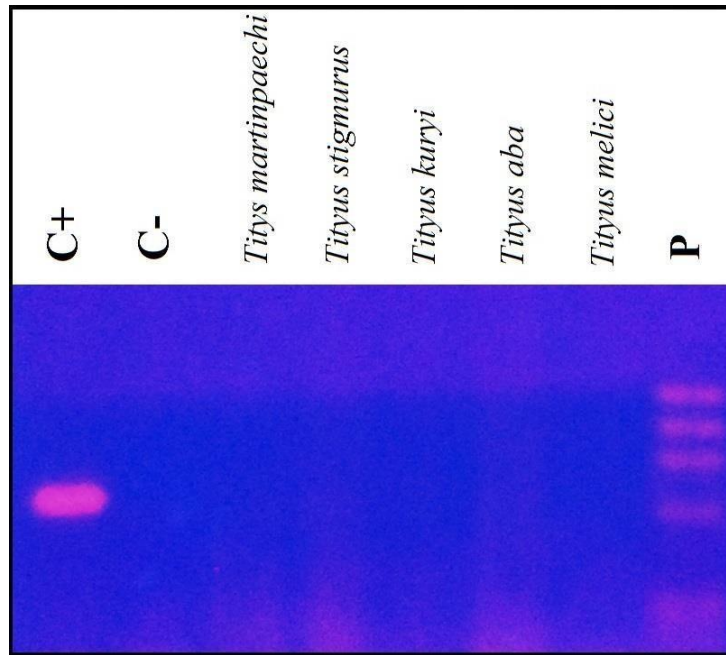


Figura 1.4: Gel de agarose apresentando bandas negativas para o marcador *ftsZ* específico para *Wolbachia*. As amostras analisadas pertencem às espécies do complexo *T. stigmurus*.

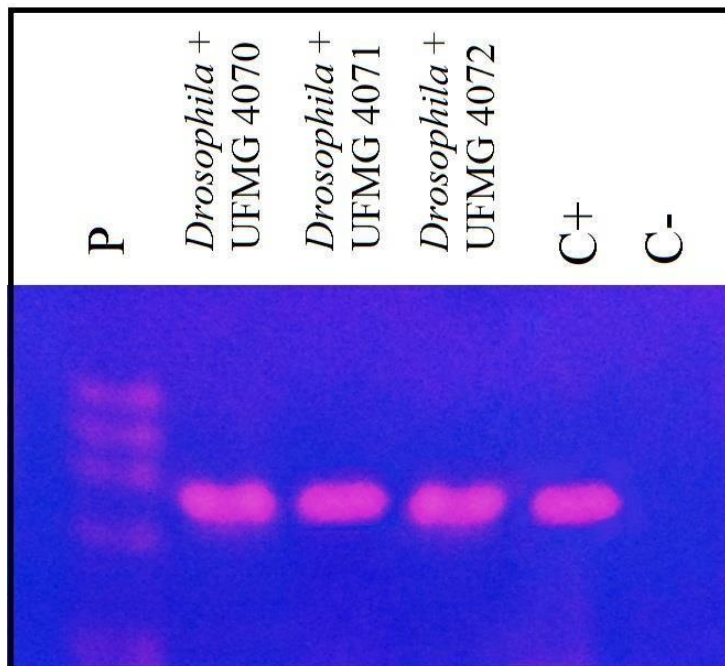


Figura 1.5: Gel de agarose apresentando bandas positivas para o marcador WSP específico para *Wolbachia*. As amostras analisadas pertencem a espécimes de *T. serrulatus* cujo DNA foi extraído em conjunto com DNA de *Drosophila* sp.

Outra possibilidade é que o resultado obtido por Suesdek-Rocha *et al.*(2007) seja causado por contaminação de amostras ou até mesmo falso positivo. A metodologia do mesmo não indica qual tecido do escorpião foi utilizado durante o experimento. Escorpiões são geralmente predadores generalistas de vários insetos, aranhas e outros animais pequenos (Polis 1990). Tecidos próximos ao sistema digestivo, quando retirados para extração de DNA, podem levar consigo material genético presente nas presas ingeridas pelo organismo analisado (King *et al.* 2008) . Além disso, apenas um fragmento amplificado para *Wolbachia* foi sequenciado, enquanto que as demais amostras foram consideradas positivas apenas pelo padrão de bandeamento em gel após a reação de PCR. Bryson Jr. (2014) comprovou, em experimentos utilizando escorpiões, que o marcador 16S tem baixa especificidade, o que pode gerar resultados falso-positivos. Bandas presentes em gel podem indicar genes de outras espécies bacterianas, o que ressalta a necessidade de sequenciamento de todas as amostras analisadas.

Uma terceira hipótese pode explicar a divergência dos resultados. Schneider *et al.* (2014) comprovou que bactérias intracelulares, que estão presentes em baixas quantidades no hospedeiro, podem não ser detectadas por métodos de PCR. A solução para esse problema pode ser revertida combinando o uso de PCR com hibridação. Nessa dissertação, as moscas *Drosophila* obtiveram sucesso na amplificação do DNA bacteriano, indicando que as reações de PCR ocorreram com sucesso. Se a bactéria está presente em *T. serrulatus*, provavelmente sua concentração é muito mais baixa que a concentração presente nas moscas. Porém, Suesdek-Rocha *et al.*(2007) utilizou o método comum de amplificação de DNA e, mesmo assim, conseguiu amplificar todos os indivíduos testados em seu experimento. Com isso, se *Wolbachia* realmente está presente nos indivíduos analisados nesse trabalho, sua concentração em escorpiões pode variar entre populações diferentes. Isso gera dúvidas se concentrações mais altas de *Wolbachia* podem gerar uma maior pressão seletiva em alelos mitocondriais do escorpião, quando comparado com hospedeiros que possuem menores concentrações bacterianas.

Pelos resultados obtidos nessa dissertação, conclui-se que a maioria das populações de *T. serrulatus* provavelmente não apresenta infecção por *Wolbachia*. Weeks *et al.* (2002) acredita que a partenogênese induzida por *Wolbachia* está presente apenas em hospedeiros haplodiplóides. Até o momento, é conhecido somente o cariótipo de *T. serrulatus* partenogenético, cujas fêmeas são diplóides (Schneider & Cella 2010). Ainda não se conhece a ploidia de machos dessa espécie, e, portanto, não

se pode afirmar se a mesma é haplodiplóide. Baseado nisso, estudos de citogética de populações sexuadas ajudariam a entender se a causa da partenogênese em *T. serrulatus* está associada à presença de bactérias. Além disso, a reprodução assexuada pode ser induzida por outros microrganismos, como bactérias pertencentes ao grupo CFB (*Cytophaga*, *Flexibacter* e *Bacteroides*), que são associadas com partenogênese em vespas e feminização em ácaros (Koivisto & Braig 2003).

A ausência de *Wolbachia* em *T. serrulatus* e nas demais espécies do complexo *T. stigmurus* não exclui a possibilidade de modificações nas frequências alélicas mitocondriais desses escorpiões. Outros microrganismos intracelulares podem se apresentar em desequilíbrio de ligação com o organismo hospedeiro (Hurst & Jiggins 2005). Por isso, são necessários estudos que envolvam a detecção de diferentes endossimbiontes em escorpiões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arthofer W., Avtzis D.N, Riegler M., Stauffer C. (2010) **Mitochondrial phylogenies in the light of pseudogenes and *Wolbachia*: re-assessment of a bark beetle dataset.** *ZooKeys* 56: 269–280
- Baldo L., Prendini L., Corthals A., Werren J.H. (2007) ***Wolbachia* are present in southern African scorpions and cluster with Supergroup F.** *Current Microbiology* 55: 367–373
- Baradaran M., Jalali A., Jolodar A. (2011) **Molecular diagnosis of *Wolbachia* endosymbiont from Iranian scorpion *Hemiscorpius lepturus* using polymerase chain reaction (PCR) amplification of 16S rDNA gene.** *Journal of Biotechnology* 10: 19802-19806
- Bazzocchi C., Jamnogluk W., O' Neill S., Anderson T., Genchi C., Bandi C. (2000) **WSP gene sequences from the *Wolbachia* of filarial nematodeos.** *Current Microbiology* 41: 96-100
- Bortoluzzi L.R., Querol M.V.M., Querol E. (2007) **Notas sobre a ocorrência de *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae) no oeste do Rio Grande do Sul, Brasil.** *Biota Neotropica* 7(3): 357–359

- Braig H.R., Zhou W., Dobson S.L., O'Neill S.L. (1998). **Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia*.** *Journal of Bacteriology* 180: 2373-2378
- Bryson R.W.Jr (2014) **Bacterial endosymbiont infections in 'living fossils': a case study of North American vaejovid scorpions.** *Molecular Ecology Resources* 14(4): 789-93
- Casiraghi M., Bordenstein S.R., Baldo L., Lo N., Beninati T., Wernegreen J.J., Werren J.H., 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
- Clark M.E., Anderson C. L., Cande J., Karr T.L. (2005) **Widespread prevalence of *Wolbachia* in laboratory stocks and the implications for *Drosophila* research** *Genetics* 170: 1667–1675
- 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
- Cuellar O. (1977) **Animal parthenogenesis.** *Science* 197: 837-843
- Dobson S.L., Bourtzis K., Braig H.R., Jones B.F., Zhou W., Rousset F., O'Neill S.L. (1999). ***Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29(2): 153-160
- Edwards R.L., Edwards E.H., Edwards A.D. (2003) **Observations of *Theotima minutissimus* (Araneae, Ochyroceratidae), a parthenogenetic spider.** *Journal of Arachnology* 31(2): 274-277
- Francke O.F. (2008) **A critical review of reports of parthenogenesis in scorpions (Arachnida).** *Revista Ibérica Arachnologia* 16: 93–104
- Gantenbein B., Fet V., Largiadèr C.R., Scholl A. (1999) **F i r s t D N A p h y l o g e n y of *Euscorpium* Thorell, 1876 (Scorpiones, Euscorpiidae) and its bearing on taxonomy and biogeography of this genus.** *Biogeographica* 75(2): 49-65

- Hoffman A.A., Turelli M., Harshman L.G. (1990) **Factors affecting the distribution of cytoplasmatic incompatibility in *Drosophila simulans***. *Genetics* 126: 933-948
- Hurst G.D.D. & Jiggins F.M. (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. Series B: Biological Sciences* 272: 1525-1534
- Hurst L.D. & Peck J.R. (1996) **Recent advances in understanding of the evolution and maintenance of sex**. *Trends in Ecology & Evolution* 11: 46-52.
- Kovařík F. (2011) **Illustrated Catalogue of Scorpions: Introductory remarks, keys to families and genera, subfamily Scorpioninae with keys to *Heterometrus* and *Pandinus* species**. *Clairon Productions* 17
- King R.A., Read D.S., Traugott M., Symondson W.O.C. (2008) **INVITED REVIEW: Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches**. *Molecular ecology* 17(4): 947-963
- Kodandaramaiah U., Weingartner E., Janz N., Dalen L., Nylin S. (2011) **Population structure in relation to host-plant ecology and *Wolbachia* infestation in the comma butterfly**. *Journal of Evolutionary Biology* 24: 2173-2185
- Jeyaprakash A., Hoy M.A. (2000). **Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species**. *Insect Molecular Biology* 9: 393-405
- Jiggins F.M. (2003) **Male-killing *Wolbachia* and mitochondrial DNA: Selective sweeps, hybrid introgression and parasite population dynamics**. *Genetics* 164: 5–12
- Johanowicz D.L. & Hoy M.A. (1995) **Molecular evidence for a *Wolbachia* endocytobiont in the predatory mite *Metaseiulus occidentalis***. *Journal of Cellular Biochemistry* 21A: 198

- Juchault P., Frelon M., Bouchon D., Rigaud T. (1994) **New evidence for feminizing bacteria in terrestrial isopods: evolutionary implications.** *l'Académie des Sciences - Series III* 317: 225–230
- King R.A., Read D.S., Traugott M., Symondson W.O.C. (2008) **Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches.** *Molecular Ecology* 17: 947-963
- Koivisto R.K.K. & Braig H.R. (2003) **Microorganism and parthenogenesis.** *Biological Journal of the Linnean Society* 79: 43-58
- Legner E.F. (1985) **Effects of scheduled high temperature on male production in thelytokous *Muscidifurax uniraptor*.** *Canadian Entomologist* 117: 383–389
- Lourenço W.R. (2001) **The Brazilian scorpion *Tityus stigmurus* (Chelicerata, Buthidae) and its complex of morphos. A new model is needed.** *Biogeographica* 77(1): 21-34
- Lourenço W.R. (2008) **Parthenogenesis in scorpions: some history – new data.** *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 14(1):19–44
- Lourenço W.R., Cuellar O. (1994) **Notes on the geography of parthenogenetic scorpions.** *Biogeographica* 70 (1): 19–23
- Maniatsi S., Bourtzis K., Abatzpoulos T.J. (2010) **May parthenogenesis in *Artemia* be attributed to *Wolbachia*?** *Hydrobiologia* 651: 317-322
- Martin O.Y., Goodacre S.L. (2009) **Widespread infections by the bacterial endosymbiont *Cardinium* in arachnids.** *Journal of Arachnology* 37(1): 106-108
- Matthiensen F.A. (1971) **The breeding of *T. serrulatus* Lutz & Mello, 1927 in captivity (Scorpiones, Buthidae).** *Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas* 4: 299-300
- O'Neill S.L., Hoffmann A.A., Werren J.H. (1997) **Influential passengers, inherited microorganisms and arthropod reproduction.** *Oxford: Oxford University Press.*

- Polis G.A. (1990) **The biology of scorpions**. *Stanford*: Stanford University Press.
- Rosa J.R.B.F. (2011) **Análise do desequilíbrio de ligação e da estrutura populacional de germoplasma brasileiro de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo.
- Ross L.K. (2010) **Confirmation of parthenogenesis in the medically significant, synanthropic scorpion "*Tityrus stigmurus*" (Thorell, 1876) (Scorpiones: Buthidae)**. *Revista Ibérica de Aracnología* 18: 115-121
- Rowley S.M., Raven R.J., McGraw E.A. (2004) ***Wolbachia pipientis* in Australian Spiders**. *Current Microbiology* 49: 208-214
- Santos M.D.S., Porto T.J., Lira-da-Silva R.M., Brazil T.K. (2014). **Description of the male of *Tityus kuryi* Lourenço, 1997 and notes about males of *Tityus stigmurus* (Thorell, 1877) and *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae)**. *ZooKeys* 435: 49–61
- Schneider D.I., Klasson L., Lind A.E., Miller W.J. (2014) **More than fishing in the dark: PCR of a dispersed sequence produces simple but ultrasensitive *Wolbachia* detection**. *BMC Microbiology* 14: 121
- Schneider M.C. & Cella D.M. (2010) **Karyotype conservation in 2 populations of the parthenogenetic scorpion *Tityus serrulatus* (Buthidae): rDNA and its associated heterochromatin are concentrated on only one chromosome**. *Journal of Heredity* 101(4): 491–496
- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P. (1994) **Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers**. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 151-701
- Sironi M., Bandi C., Sacchi L., Di Sacco B., Damiani G., Genchi C. (1995) **Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm**. *Molecular Biochemistry Parasitology* 74: 223-227

- Souza C.A.R., Candido D.M., Lucas S.M., Brescovit A.D. (2009) **On the *Tityus stigmurus* complex (Scorpiones, Buthidae).** *Zootaxa* 1987: 1–38
- Stouthamer R. & Werren J.H. (1993) **Microbes associated with parthenogenesis in wasps of the genus *Trichogramma*.** *Journal of Invertebrate Pathology* 61: 6-9
- Stouthamer R. & Luck R.F. (1991) **Transition from bisexual to unisexual cultures in *Encarsia perniciosi* Tower (Hymenoptera; Aphelinidae): New data and a reinterpretation.** *Annals of the Entomological Society of America* 84: 150-157
- Suesdek-Rocha L., Bertani R., Silva-Junior P.I., Selivon D. (2007) **The first record for *Wolbachia* in a scorpion: the parthenogenetic yellow scorpion *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae).** *Revista Ibérica de Aracnologia* 14: 183-184
- Tanaka H., Roubik D.W., Kato M., Liew F., Gunsalam G., (2001) **Phylogenetic position of *Apis nuluensis* on northern Borneo and phylogeography of *A. cercana* as inferred from mitochondrial DNA sequences.** *Insectes Sociaux* 48: 44–51
- Teixeira L., Ferreira Á., Ashburner M. (2008) **The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*.** *PLoS biology* 6(12): e1000002
- Turelli M., Hoffmann A.A., McKechnie S.W. (1992) **Dynamics of cytoplasmic incompatibility and mtDNA variation in natural *Drosophila simulans* populations.** *Genetics* 132: 713–723
- Weeks A.R., Reynolds K.T. & Hoffmann A.A. (2002) ***Wolbachia* dynamics and host effects: What has (and has not) been demonstrated?** *Trends in Ecology & Evolution* 17: 257–262
- Werren J.H. (1997) **Biology of *Wolbachia*.** *Annual Review of Entomology* 42: 587-609

- Werren J.H., Windsor D.M. (2000) ***Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium?** *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 267:1277–1285
- Werren J.H., Windsor D., Guo L.R. (1995) **Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods.** *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 262:197–204
- Zeh D.W., Zeh J.A., Bonilla M.M. (2005) ***Wolbachia*, sex ratio bias and apparent male killing in the harlequin beetle riding pseudoscorpion.** *Heredity* 95: 41–49
- Zhou W., Rousset F., O’Neill S.L. (1998) **Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences.** *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 265: 509-515

CAPÍTULO II

Delimitação de espécies de escorpiões do complexo

***Tityus stigmurus* (Buthidae)**

RESUMO

A história taxonômica dos escorpiões do complexo *Tityus stigmurus* apresenta divergências em relação aos limites de espécies de seus representantes. Isso ocorre principalmente com *T. martinpaechi*, *T. serrulatus* e *T. stigmurus*, que são considerados por alguns autores como variações de coloração e granulação do tegumento de uma mesma espécie. Além disso, *T. serrulatus* tem sido apontado como uma variação geográfica e partenogenética de *T. stigmurus*. Nesse trabalho, utilizei a história evolutiva dos genes mitocondriais COI e 16S e do gene nuclear ITS2 para delimitar as espécies do complexo. Empreguei as genealogias obtidas por Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana para testar hipóteses de delimitação e utilizei uma análise de coalescência profunda para testar essas hipóteses. Todas as análises indicam que o complexo *T. stigmurus* é monofilético. Porém, das seis espécies que compõem o complexo, apenas *T. melici* e *T. kuryi* apresentam-se como monofiléticas. *Tityus kuryi* possui características morfológicas que o distingue facilmente das demais espécies do complexo, mas o mesmo não ocorre com *T. melici*. Análises de coalescência indicaram a existência de três linhagens evolutivas, sendo duas linhagens referentes às espécies monofiléticas e a terceira linhagem composta por *T. aba*, *T. martinpaechi*, *T. serrulatus* e *T. stigmurus*. Comparei os resultados com descrições morfológicas de cada espécie e através de observações realizadas durante o trabalho. Alguns indivíduos possuem caracteres morfológicos intermediários às quatro espécies. A coloração e características de granulação do tegumento não parecem ser confiáveis para a delimitação dessas espécies e os resultados observados a partir de dados moleculares demonstram que as mesmas podem ser sinonimizadas. Essas conclusões trazem implicações para diversas áreas de estudo e de saúde pública, uma vez que *T. serrulatus* e *T. stigmurus* são causadores de acidentes graves no Brasil.

ABSTRACT

The taxonomic history of the scorpions of the *Tityus stigmurus* complex shows disagreements over the limits of their species. This occurs mainly to *T. martinpaechi*, *T. serrulatus* and *T. stigmurus*, which are considered by some authors as variants in color and tegument granulation of a single species. In addition, *T. serrulatus* has been treated as a geographic, parthenogenetic variation of *T. stigmurus*. In this study, I used the evolutionary history of the mitochondrial genes COI and 16S and of the nuclear ITS2 to delimit species within the complex. I employed genealogies obtained by Maximum Likelihood and Bayesian Inference to test delimitation hypotheses and used a deep coalescence analysis to test these hypotheses. All analyses indicate that the complex is monophyletic. However, of the six species that composes the complex, only *T. melici* and *T. kuryi* emerge as monophyletic. *Tityus kuryi* has morphological characteristics that easily distinguish it from other species of the complex, but the same does not occur to *T. melici*. Coalescence analyses indicate the existence of three evolutionary lineages within the complex, two of them corresponding to those monophyletic species and a third consists of *T. aba*, *T. martinpaechi*, *T. serrulatus* and *T. stigmurus*. I compared the results with morphological descriptions of each species and through observations made during this study. Some individuals have intermediate morphological characters among the four species. Color and granulation characters do not seem to be reliable for the delimitation of these species and the results observed from molecular data show that they can be synonymized. These findings have implications for many study areas and public health, since *T. serrulatus* and *T. stigmurus* are cause serious accidents in Brazil.

INTRODUÇÃO

O correto agrupamento de indivíduos, de uma ou mais populações, em espécies constitui uma etapa essencial para a comunicação e a organização de informações em áreas como ecologia (Isaac *et al.* 2004), conservação (Karl & Bowen 1999) ou bioquímica (King *et al.* 2008). Além disso, estudos e programas de controle de animais peçonhentos, assim como projetos de inovações biotecnológicas, necessariamente envolvem o reconhecimento de indivíduos como membros de uma espécie (Senff-Ribeiro *et al.* 2008, Vetter & Isbister 2008). Consequentemente, um dos principais objetivos da biologia evolutiva é entender os processos que promovem a especiação (Carstens & Dewey 2009) e, para entender esses processos, primeiro é necessário reconhecer e delimitar linhagens evolutivas (Sites & Marshall 2003).

Abordagens tradicionais de identificação de espécies animais, como o exame de caracteres morfológicos, não são suficientes para espécies crípticas e de especiação recente, uma vez que estas possuem pouca variação morfológica (Mayr 1997). Por isso, a delimitação de espécies, processo pelo qual os limites entre um grupo de espécies são determinados, é um dos principais tópicos na sistemática moderna (Wiens 2007). Assim, nos últimos anos foram sugeridos novos métodos, utilizando dados moleculares, para a delimitação de espécies, incluindo abordagens baseadas em teoria de coalescência e avaliação de uma árvore gênica, dadas duas árvores de espécies (Knowles & Carstens 2007).

Questões envolvendo delimitação de espécie são moldadas por definições conceituais dessa categoria, e suas relações com critérios operacionais utilizados para criar hipóteses em relação à existência de um determinado táxon (Ross *et al.* 2009). Atualmente, muitos pesquisadores consideram que espécies seriam grupos monofiléticos de indivíduos, não necessariamente, mas frequentemente, isolados reprodutivamente (Wheeler & Platnick 2000). Porém, esse conceito não se aplica a diversas situações, como, por exemplo, espécies com especiação recente, cujo monofiletismo recíproco ainda não foi alcançado. Para resolver conflitos entre diferentes conceitos de espécies, de Queiroz (2007) propôs o conceito unificado de espécies, em que estas seriam linhagens de metapopulações evoluindo separadamente. De acordo com este conceito, espécies não seriam necessariamente grupos monofiléticos, já que ao longo da divergência de duas espécies, elas passariam por uma fase de polifiletismo, depois por um período em que apenas uma é monofilética e a

outra é parafilética, para então atingir o monofiletismo recíproco (Avice *et al.* 1987 — Figura 2.1). Assim, restringir o conceito de espécies a grupos monofiléticos levaria à exclusão de linhagens de divergência recente.

A teoria coalescente, que é a teoria probabilística sobre a história evolutiva de alelos, proporciona um quadro mais promissor para identificar espécies crípticas, uma vez que seu objetivo central é detectar linhagens evoluindo independentemente (Fujita *et al.* 2012). Discordâncias entre árvores de espécies e árvores de genes podem ocorrer devido a processos aleatórios, como o polimorfismo ancestral, na qual a divergência entre duas espécies ocorre após a coalescência de dois alelos dos indivíduos dessas espécies (Maddison 1997). Para propor hipóteses de limites de espécies a partir de uma abordagem coalescente, torna-se importante a utilização de marcadores não ligados, a fim de atenuar os efeitos da aleatoriedade inerente à deriva genética (Carstens & Dewey 2010). Dessa forma, a partir da história evolutiva de um ou mais alelos, e sua relação com determinadas árvores de espécies, é possível testar hipóteses sobre a divergência de linhagens em um determinado grupo, cujos caracteres morfológicos não sejam suficientes para sua delimitação (Knowles & Carstens 2007, Fujita *et al.* 2012).

Revisão taxonômica do complexo *T. stigmurus*

O gênero *Tityus* Koch, 1836, possui o maior número de espécies descritas de escorpiões (Fet *et al.* 2000) e atualmente está dividido em cinco subgêneros: *Archaeotityus* Lourenço 2006, *Atreus* Gervais 1843, *Brazilotityus* Lourenço 2006, *Caribetityus* Lourenço 1999 e *Tityus* Koch 1836 (Lourenço 2006). O subgênero *Tityus* inclui dois complexos de espécies: o complexo *Tityus confluens* (*sensu* Lourenço & Silva 2006) e o complexo *Tityus stigmurus* (*sensu* Lourenço 1981, 2001).

Thorell (1877) descreveu *Isometrus stigmurus*, que posteriormente foi transferida para *Tityus* (Kraepelin 1899). Seu primeiro registro foi feito no estado de Pernambuco, porém até o início do século XX essa espécie era encontrada em Minas Gerais e no sul de Goiás (Vellard 1932, Lourenço & Cloudsley-Thompson 1996, Lourenço 2001), com registros concentrados após esse período no nordeste do Brasil. Em 1922, Lutz & Mello descreveu *T. serrulatus* a partir de uma população de Belo Horizonte, Minas Gerais. Vellard (1932) propôs que *T. stigmurus* e *T. serrulatus* eram sinônimos, sendo a primeira espécie (*T. stigmurus typicus*) encontrada no norte e a

segunda (*T. serrulatus typicus*) encontrada no sul do país. *Tityus acutidens* Mello-Leitão 1933, encontrado em Tocantins, apesar de muito semelhante a *T. serrulatus*, foi distinguido dessa espécie durante sua descrição, mas as diferenças não foram descritas em detalhe (Souza *et al.* 2009). Mello-Leitão (1939) rejeitou a sinonímia proposta por Vellard e no mesmo trabalho descreveu a subespécie *T. serrulatus vellardi*. Esse mesmo autor, em 1945, sugeriu que *T. serrulatus* (nesse momento dividido em duas subespécies, *T. serrulatus serrulatus* e *T. serrulatus vellardi*) estava proxivamente relacionado a *T. stigmurus* e *T. acutidens*, formando um grupo de espécies.

Lourenço (1981) descreveu *Tityus lamottei* e sinonimizou *T. serrulatus vellardi* com *T. serrulatus serrulatus*, propondo o complexo *T. stigmurus*, nesse momento composto por essas três espécies. *T. stigmurus* foi considerado a forma sexuada do complexo, distribuída no norte do Brasil, enquanto *T. serrulatus* seria a forma partenogenética, encontrada no sul do país (Lourenço & Clousdley-Thompson 1996, Lourenço *et al.* 1996).

Matthiesen (1962) demonstrou que *T. serrulatus* se reproduzia por partenogênese, que foi considerada a única forma de reprodução dessa espécie por muitos anos. Lourenço & Clousdley-Thompson (1999) encontraram uma população sexuada de *T. serrulatus* no norte de Minas Gerais. A principal diferença morfológica da população sexuada em relação às populações partenogenéticas seria a ausência de serrilha nos segmentos do metassoma, característica que dá o nome à espécie. Nesse mesmo trabalho, os autores consideram *T. lamottei* como sinônimo júnior de *T. stigmurus* e informalmente sugerem a sinonimização de *T. serrulatus* e *T. stigmurus*. Propõe também uma classificação a partir da coloração: forma unifasciata, com uma listra escura sobre os tergitos (correspondente a *T. stigmurus*); forma confluenciata, com manchas confluentes sobre os tergitos (correspondente a *T. serrulatus*); forma confluenciata/maculata, com mesmo padrão de confluenciata, porém com manchas nas pernas e pedipalpos (correspondente a *T. lamottei*); forma trifasciata, com três listras escuras sobre os tergitos (referente a indivíduos encontrados no Ceará, até então não descritos).

Lourenço (2001) descreveu os indivíduos pertencentes à forma trifasciata e os nomeou *Tityus martinpaechi*, baseado em uma fêmea adulta. O macho foi posteriormente descrito, a partir também de um único exemplar (Souza *et al.* 2006). *Tityus aba* foi descrito e inserido no complexo *T. stigmurus*, sendo sugerido como mais próximo de *T. stigmurus* (Candido *et al.* 2005), apesar de apresentar as características

de coloração que caracteriza a forma trifasciata. Souza *et al.* (2009) revisaram o complexo e redescreveram o macho de *T. serrulatus*, encontrado em Januária, Minas Gerais. De acordo com esses autores, a população descrita por Lourenço & Clousdley-Thompson (1999) pertence à *Tityus melici* Lourenço 2003. Nesse mesmo trabalho, *T. lamottei* e *T. acutidens* foi considerado sinônimo júnior de *T. serrulatus* e *Tityus kuryi* Lourenço 1997, conhecido até então apenas pela fêmea, foi inserido no complexo. O macho de *T. kuryi* foi descrito por Santos *et al.* (2014), no mesmo trabalho em que apresentam uma chave de identificação para as seis espécies que atualmente pertencem ao complexo: *T. aba*, *T. kuryi*, *T. martinpaechi*, *T. melici*, *T. serrulatus* e *T. stigmurus* (Figura 2.2).

As espécies do complexo podem ser identificadas pela presença de segmentos metassomais I a IV com coloração amarelada e manchas escuras na porção ventrolateral; segmento metassomal V com uma mancha negra ocupando o centro da parte distal; carinas dorso-laterais dos segmentos II a IV com um a dez grânulos posteriores espinóides com tamanho variável e ausência de lobo basal nos palpos de machos (Lourenço 1981, Souza *et al.* 2009). As principais variações morfológicas de cada espécie podem ser vistas no Anexo 2. Apesar dos escorpiões deste grupo serem facilmente reconhecíveis entre si por caracteres morfológicos (Souza *et al.* 2009), os limites entre as espécies são controversos. A solução dessa controvérsia requer um estudo de delimitação de espécies, a fim de testar o limite filogenético entre as mesmas. Assim, meu objetivo nesse capítulo é investigar as relações filogenéticas e os limites das espécies do complexo *Tityus stigmurus*, utilizando ferramentas de análise molecular.

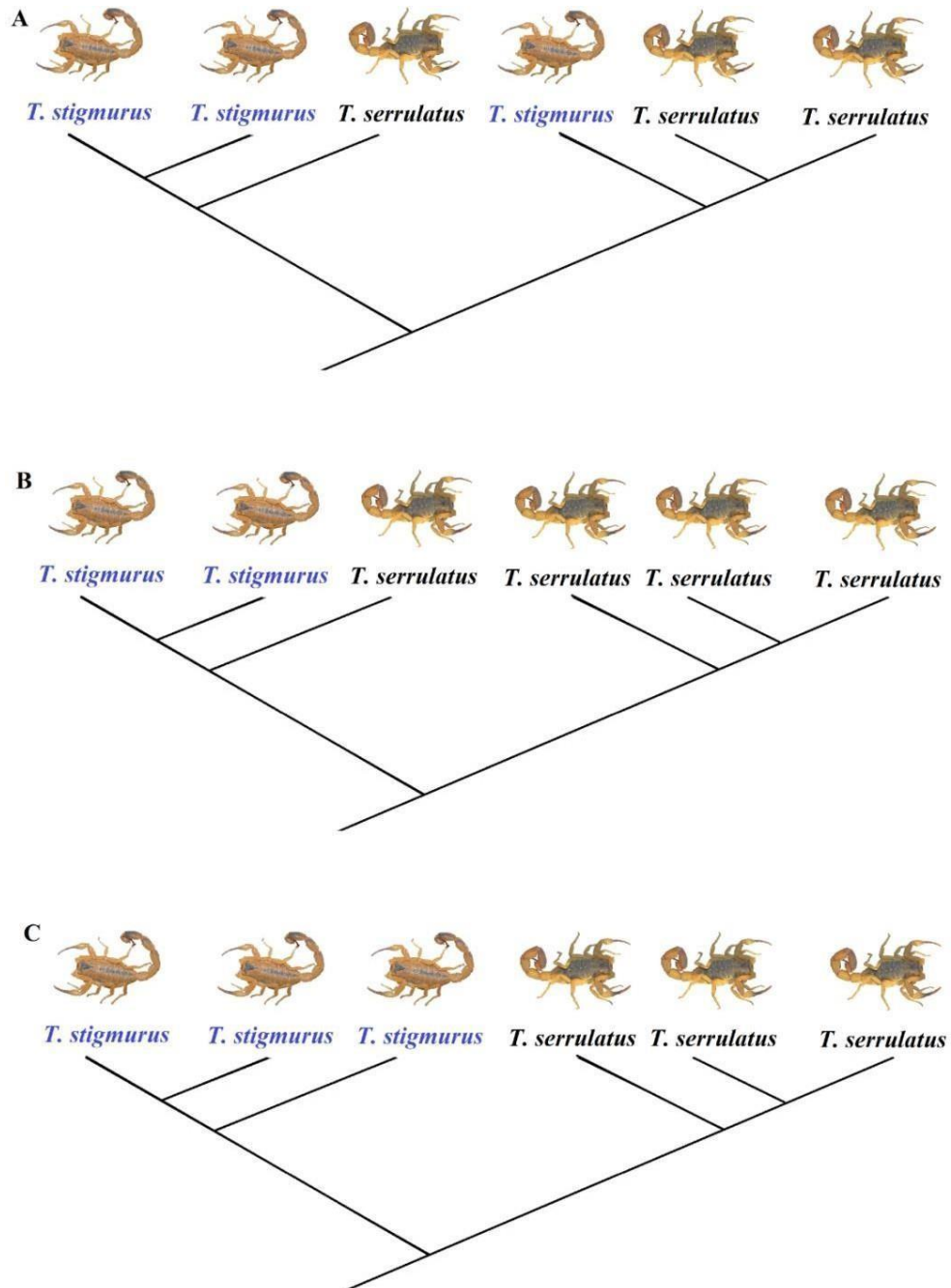


Figura 2.1: Processo de evolução de linhagens monofiléticas a partir da especiação, ilustrado com escorpiões do complexo *Tityus stigma*. A- Polifiletismo entre *T. serrulatus* e *T. stigmurus*. B- *T. stigmurus* torna-se monofilético, enquanto *T. serrulatus* encontra-se parafilético. C- *T. serrulatus* torna-se monofilético. Os desenhos acima são apenas ilustrativos e não representam a história das duas espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e preparo dos espécimes

Obtive os espécimes utilizados nesse estudo através de coletas e empréstimos de coleções taxonômicas (Figuras 2.3 e 2.4). Foram realizadas coletas diurnas e noturnas, durante os anos de 2010 e 2012, abrangendo regiões de ocorrência de espécies do complexo *Tityus stigmurus* nos estados de Minas Gerais, Bahia, Piauí, Ceará e Pernambuco. Foram coletados representantes das seis espécies pertencentes ao complexo, incluindo duas populações sexuadas de *T. serrulatus*, de acordo com a taxonomia sugerida por Souza *et al.* (2009). Além das espécies do complexo, também foram coletados escorpiões que analisei como grupo externo. Os animais foram encontrados em regiões de Floresta Estacional Decídua (mata seca) e Cerrado, além de regiões semi-urbanas. Os pontos de coleta foram georreferenciados com um GPS, nos locais de coleta. Nas coletas diurnas, os aracnídeos foram procurados embaixo de pedras e de troncos. Para as coletas noturnas, foram utilizadas lanternas de luz ultravioleta, uma vez que escorpiões fluorescem quando iluminados sob este comprimento de onda (Figura 2.5). Armazenei todos os espécimes em álcool 95-100% e mantive-os refrigerados até a extração do tecido para análise molecular. Depositei o material testemunho na coleção de aracnídeos das Coleções Taxonômicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais (UFMG, curador Adalberto J. Santos) e Instituto Butantan, São Paulo (IBSP, Antonio D. Brescovit).

Foram também obtidos espécimes armazenados em álcool 70-100% nas seguintes coleções: Coleção de História Natural da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí (CHNUFPI, curador Leonardo S. Carvalho); Coleções Taxonômicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais (UFMG, Adalberto J. Santos); Instituto Butantan, São Paulo (IBSP, Antonio D. Brescovit); Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo (MZSP, Ricardo Pinto-da-Rocha); Museu de Zoologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia (UFBA, Tânia K. Brazil). Georreferenciei os espécimes que não possuíam coordenadas geográficas com a ferramenta Google Earth™.

Durante as coletas, encontrei uma população sexuada localizada em Contendas do Sincorá, Bahia (Figura 2.6) cujos caracteres morfológicos são próximos aos descritos para *T. serrulatus*, porém com algumas semelhanças com *T. melici*. Nesta dissertação,

chamarei os indivíduos dessa população por “*T. cf. serrulatus*”. Para diferenciar as populações sexuadas de *T. serrulatus* de Itacarambi (MG) das populações partenogenéticas dessa espécie, as chamarei de “*T. serrulatus* Ita”. Uma população de *T. stigmurus*, situada em Paripiranga (Bahia), não se apresentou monofilética em relação aos demais indivíduos dessa espécie; para diferenciá-la, a mesma receberá a denominação “*T. stigmurus* Par”.

Construí mapas de distribuição dos espécimes usados nas análises moleculares através do programa SimpleMappTM (<http://www.simplemapp.net>). Fotografei alguns espécimes com uma câmera Nikon D3300, e editei as imagens no Adobe PhotoshopTMCS6. Alguns desses exemplares foram escolhidos devido à divergência na identificação morfológica em relação aos resultados encontrados nas análises moleculares.



Figura 2.2: Espécimes vivos de representantes do complexo *Tityus stigmurus*. A- *T. stigmurus*, jovem do Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí. Foto por L.S. Carvalho. B- *T. kuryi*, fêmea de Mata do Capão, Palmeiras. Foto por T.J. Porto. C- *T. serrulatus*, fêmea de Macará, Bahia. Foto por L.S. Carvalho. D- *T. martinpaechi*, fêmea do Parque Nacional Ubajara, Ceará. Foto por L.S. Carvalho. E- *T. aba*, fêmea de Floresta Nacional Contendas do Sincorá, BA; F- *T. melici*, macho do Parque Estadual de Grão Mogol, Minas Gerais.

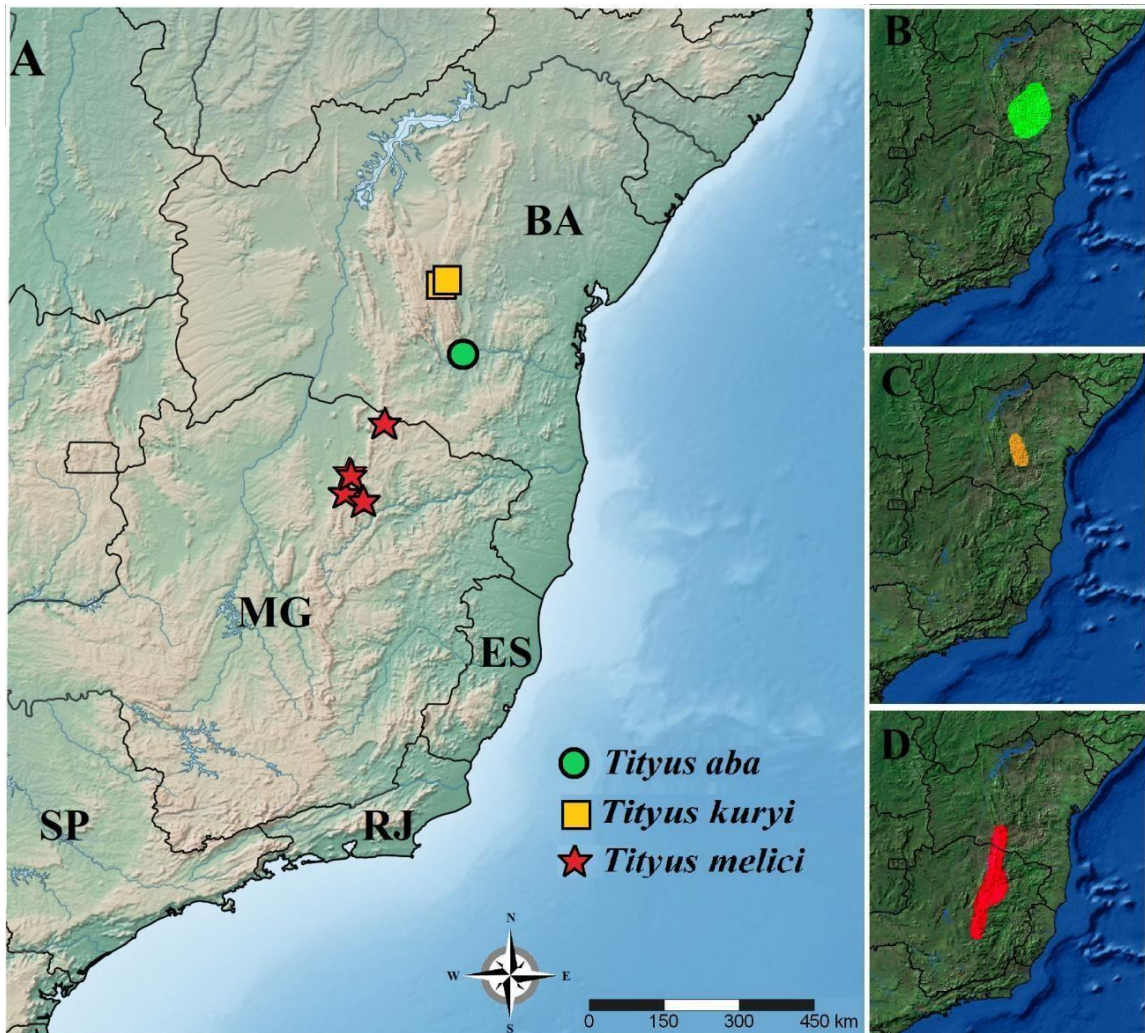


Figura 2.3: A- Distribuição geográfica de espécimes de *Tityus aba*, *T. kuryi* e *T. melici* amostrados para análises moleculares neste trabalho. B- Distribuição geográfica de *T. aba*. C- Distribuição geográfica de *T. kuryi*. D- Distribuição geográfica de *T. melici*. B, C e D: modificados (Almeida 2010).

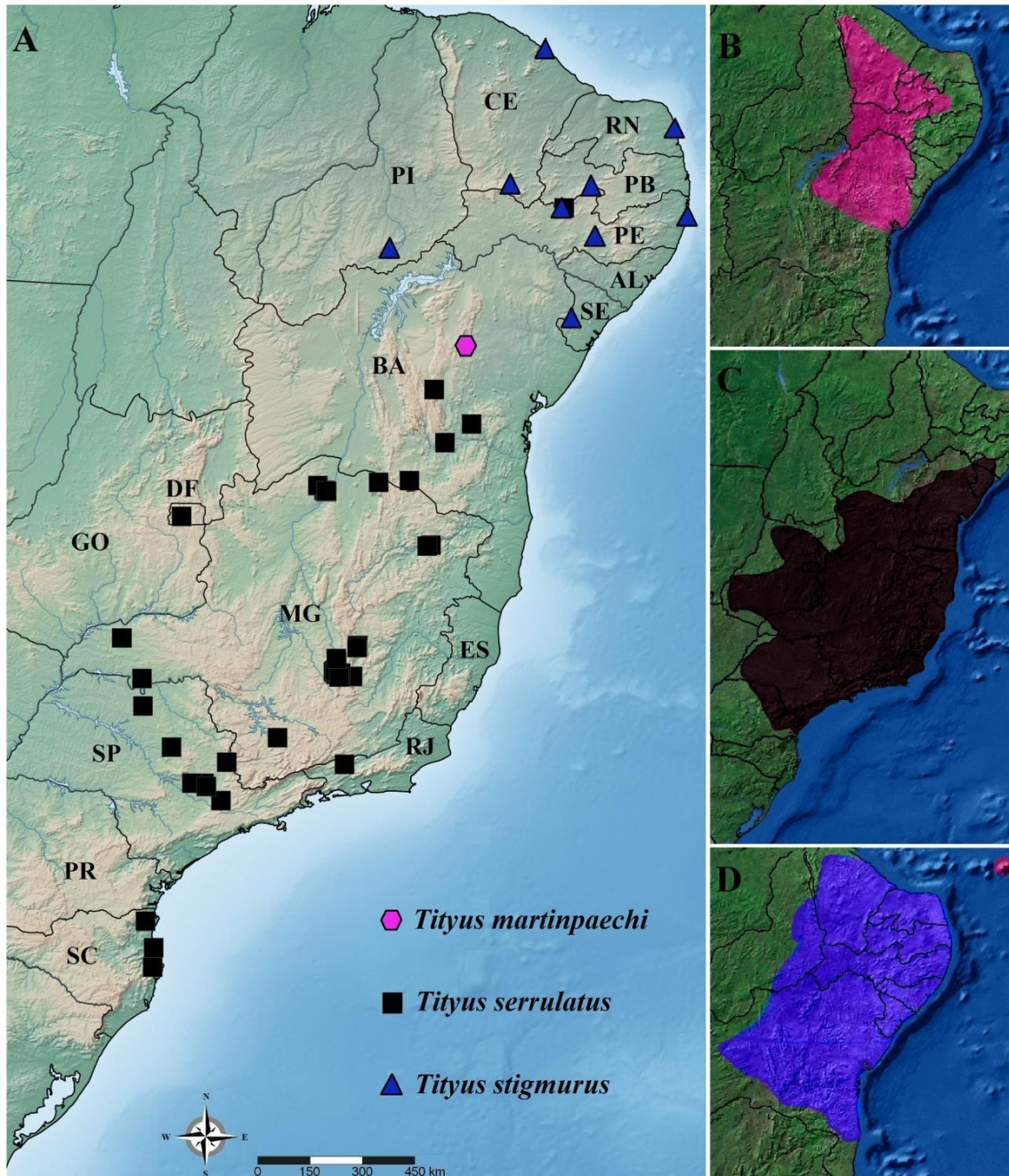


Figura 2.4: A- Distribuição geográfica de espécimes de *Tityus martinpaechi*, *T. serrulatus* e *T. stigmurus* amostrados para análises moleculares neste trabalho. B- Distribuição geográfica de *T. martinpaechi*. C- Distribuição geográfica de *T. serrulatus*. D- Distribuição geográfica de *T. stigmurus*. B, C e D: modificados (Almeida, 2010).



Figura 2.5: Espécime vivo de *Tityus aba*, fotografado em Contendas do Sincorá (Bahia), sob luz branca (esquerda) e sob luz ultravioleta (direita).



Figura 2.6: Fêmea (esquerda) e macho (direita) de *Tityus cf. serrulatus* coletados em Contendas do Sincorá (Bahia).

Análises moleculares

Para a extração de DNA, retirei duas pernas de cada espécime. Dissequei ambas para a remoção de músculos, que foram macerados e submetidos ao processo de extração de DNA de acordo com o protocolo do kit *Wizard™ Genomic DNA Purification Kit* (Promega). Submeti o DNA obtido na extração à técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), com iniciadores para os genes Citocromo Oxidase I específico para insetos, RNAr 16S específico para escorpiões e Espaçador Interno Transcrito II (ITS2) específico para aranhas (Tabela 2.1). Para o gene COI, as reações de PCR incluíram desnaturação a 94 °C por cinco minutos, quatro ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 48 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por um minuto; 29 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 52 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por um minuto; última fase de extensão a 72 °C por cinco minutos. Para o gene 16S, as reações foram compostas de desnaturação inicial a 94 °C por cinco minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 48 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos e fase de extensão final a 72 °C por sete minutos. Para o gene ITS2, as reações incluíram desnaturação inicial a 94°C por dois minutos; 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 47°C por 35 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos e fase de extensão final a 72°C por três minutos.

Tabela 2.1: Genes usados nesse trabalho, bem como o nome dos iniciadores de cada gene, sua sequência nucleotídica e os autores correspondentes.

Gene	Iniciadores	Sequências	Referência
COI	C1-J-2183	CAACATTTATTTTGATTTTTTGG	Simon <i>et al.</i> 1994
	COIKG-R2	GATATTAATCCTAAAAAATGTTGAGG	Tanaka <i>et al.</i> 2001
16S	16SF	CGATTTGAACTCAGATCA	Gantembein <i>et al.</i> 1999
	16SR	GTGCAAAGGTAGCATAATCA	Gantembein <i>et al.</i> 1999
ITS2	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> 1990
	ITS5.8	GGGACGATGAAGAACGCAGC	White <i>et al.</i> 1990

Para avaliar os resultados da amplificação, submeti o material resultante à eletroforese em gel de agarose 1% e corado com GelRed™, e usei como controle positivo amostras de escorpiões com COI, 16S e ITS2 previamente amplificados e sequenciados, juntamente com controle negativo resultante de reações de PCR sem DNA. A presença de bandas bem definidas no gel indicou reações de amplificação bem sucedidas. Purifiquei os fragmentos amplificados através do protocolo de limpeza com Polietilenoglicol (Polietilenoglicol 20% e NaCl 2,5M). Fiz a reação de sequenciamento utilizando *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit* e purifiquei as amostras com acetato de amônio 7,5M. Sequenciei os genes em ambos os sentidos em um sequenciador automático ABI 3130x Genetic Analyser (Applied Biosystems). Comparei as sequências obtidas com sequências depositadas no GenBank, através da ferramenta Blast™, a fim de verificar se houve contaminação das amostras.

Avaliei a qualidade das sequências e obtive a sequência consenso de cada indivíduo utilizando os programas phred/Phrap e Consed (Ewing *et al.* 1998, Gordon *et al.* 1998). Alinhei as sequências usando o alinhamento progressivo Muscle (Edgar 2004) implementado no MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013) e, nesse mesmo programa, editei as sequências, comparando-as com o cromatograma original.

Análises filogenéticas

Fiz as análises com as sequências dos marcadores COI, 16S e ITS2, concatenadas e separadamente. Montei dois conjuntos de dados concatenados, um com os três genes e outro apenas com os genes mitocondriais, utilizando o programa Mesquite 2.75 (Maddison & Maddison 2011). Os conjuntos com sequências concatenadas incluíram apenas espécimes sequenciados com sucesso para todos os marcadores envolvidos. A lista do material utilizado nas análises moleculares, com suas respectivas localidades e genes amplificados, encontra-se no Anexo 3.

Para cada marcador e para os conjuntos de dados concatenados, utilizei o programa JModelTest 2.1.4 (Darriba *et al.* 2012), a fim de inferir o melhor modelo de evolução molecular. O modelo de melhor ajuste para cada análise foi escolhido a partir de 88 modelos potenciais, de acordo com o critério de informação de Akaike (AIC). Usei os modelos mais adequados para a construção de árvores filogenéticas, obtidas

através dos métodos de Inferência Bayesiana (IB) e Máxima Verossimilhança (MV), e para a delimitação de espécies.

Para a Inferência Bayesiana, utilizei o programa MrBayes 3.2.3 (Ronquist & Huelsenbeck 2003), mantendo os *priors* dos parâmetros com valores padrões do programa. Fiz duas corridas paralelas, cada uma com quatro Cadeias de Markov-Monte Carlo, sendo uma cadeia fria e três cadeias aquecidas. Cada corrida incluiu 10.000.000 de gerações, com amostragem de parâmetros a cada 1.000 gerações. Eliminei 25% dos estágios iniciais como *burn in* e sumariizei as árvores da fase estacionária das cadeias, obtendo a probabilidade posterior dos cladogramas. Para avaliar a convergência das corridas, utilizei o programa Tracer 1.6 (Drummond *et al.* 2012).

Para análise de Máxima Verossimilhança, utilizei o programa RAxML (Stamatakis 2006), através do servidor RAxML-HPC BlackBox8.1.11 implementado na plataforma CIPRES (Miller *et al.* 2010). O suporte de cada clado foi estimado a partir de *Bootstrap* com 1.000 replicações. Visualizei e editei as árvores obtidas por Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança através do programa FigTree (Rambaut 2012).

Teste de hipóteses de delimitação de espécies

Testei cinco hipóteses de delimitação de espécies, de acordo com evidências e sugestões apresentadas na literatura e com os resultados observados nas análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana (Tabela 2.2). A hipótese 3 foi baseada em Lourenço (2001), que propôs que *T. martinpaechi*, *T. serrulatus* e *T. stigmurus* seriam variações morfológicas da mesma espécie. Entretanto, acrescentei *T. aba* como outra variação, uma vez que as árvores filogenéticas obtidas nas análises descritas acima apresentam *T. aba* e espécimes de *T. cf. serrulatus* em uma mesma linhagem. Os arquivos de saída para cada hipótese foram preparados no programa BEAUti, disponível no STAR BEAST 1.8.0 (Drummond & Rambaut 2012).

Para a delimitação de espécies, usei somente exemplares de *T. serrulatus* partenogenéticos que apresentaram sucesso na amplificação dos três genes. Isso foi possível porque as sequências desses exemplares são idênticas para os genes ITS2 e 16S e diferem em um único sítio no gene COI.

Obtive a distribuição posterior de cada hipótese através da ferramenta Beast 1.8.0, disponível na plataforma CIPRES. Para cada uma das cinco hipóteses, mantive as taxas de substituição por par de bases com valores iguais a 1.0 e todos os outros *priors*

dos parâmetros no padrão do programa. Fiz duas corridas de 50.000.000 gerações, com amostragem a cada 5.000 gerações. Avaliei a qualidade das corridas e testei a diferença entre as hipóteses no programa Tracer 1.6, através do critério AICM. Sumarizei a árvore de espécie de maior probabilidade posterior no programa TreeAnnotator, disponível no STAR BEAST 1.8.0, com valores de *burn in* iguais a 10%.

Tabela 2.2: Hipóteses de limites de espécies testadas nesse trabalho.

Hipóteses	Abordagem
Hipótese 1	Cada uma das seis espécies do complexo é tratada em um ramo independente da árvore de espécies (Souza <i>et al.</i> 2009).
Hipótese 2	<i>T. serrulatus</i> e <i>T. stigmurus</i> : mesmo ramo da árvore de espécies (Lourenço & Cloudsley-Thompson 1999). Demais espécies: ramos independentes.
Hipótese 3	<i>T. aba</i> , <i>T. martinpaechi</i> , <i>T. serrulatus</i> e <i>T. stigmurus</i> : mesmo ramo da árvore de espécies (Lourenço 2001. Exceto <i>T. aba</i> , descrito posteriormente). Demais espécies: ramos independentes.
Hipótese 4	<i>T. aba</i> e <i>T. serrulatus</i> : mesmo ramo da árvore de espécies. <i>T. martinpaechi</i> e <i>T. stigmurus</i> : mesmo ramo da árvore de espécies. Demais espécies: ramos independentes.
Hipótese 5	<i>T. aba</i> , <i>T. melici</i> , <i>T. martinpaechi</i> , <i>T. serrulatus</i> e <i>T. stigmurus</i> : mesmo ramo da árvore de espécies. <i>T. kuryi</i> : ramo independente.

RESULTADOS

Sequenciei um total de 215 indivíduos, 204 pertencentes ao complexo *T. stigmurus* e 11 espécimes usados como grupo externo. O grupo externo foi composto por nove espécimes de *Tityus* (um *Tityus bahiensis* Perty 1833; três *T. costatus* Karsch, 1879; um *T. thelyacanthus* Mello-Leitão 1933; e duas espécies não determinadas), um exemplar de *Rhopalurus* Thorell 1876 (Buthidae) e um espécime de *Opisthacanthus* Peters 1861 (Liochelidae) (Anexo 4).

Após a edição das sequências, os dados concatenados apresentaram no alinhamento final um total de 1098 pares de bases, contendo 27,87% de sítios variáveis e 20 sítios com inserções/deleções (Anexo 5). As sequências de *T. serrulatus* das populações partenogenéticas foram idênticas, exceto para o gene COI, no qual apenas um sítio pode conter Adenina ou Guanina. Cada análise apresentou um modelo apropriado, todos com inclusão do parâmetro Gamma, associado ao parâmetro Invgamma na maioria das análises (Tabela 2.3).

Tabela 2.3: Modelos de evolução de nucleotídeos para cada gene e para cada conjunto de dados concatenados.

Conjunto de dados	Melhor modelo de evolução de nucleotídeos
COI	TPM2 μ + I + G
16S	GTR + G
ITS	JC + G
COI + 16S	GTR + I + G
COI + 16S + ITS	GTR + I + G

Genealogia a partir de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana

O monofiletismo do complexo *T. stigmurus* foi recuperado em todas as análises de MV e IB. No geral, *T. kuryi* e *T. melici* apresentaram-se monofiléticos e com altos valores de suporte de ramo, o que não ocorreu para as demais espécies do complexo (Figuras 2.7, 2.8, 2.10 e 2.11). Para os genes mitocondriais e análises concatenadas, *T. cf. serrulatus* SCS apresenta-se sempre agrupado com *T. aba*. O mesmo acontece com a população de *T. stigmurus* Par e *T. martinpaechi*.

Genealogia a partir de COI

As árvores geradas por MV e IB foram idênticas. A monofiletismo do complexo *T. stigmurus* foi observado na análise de MV, porém com baixo suporte (*bootstrap* = 69). Populações de *T. serrulatus* partenogenéticas e *T. serrulatus* Ita formam um clado bem sustentado (*bootstrap* = 91, probabilidade posterior = 1). O marcador COI foi também o único a apresentar as populações de *T. serrulatus* partenogenéticas em monofiletismo recíproco com *T. serrulatus* Ita. O clado formado por *T. martinpaechi* e *T. stigmurus* Par também se encontra bem sustentado (*bootstrap* = 99, probabilidade posterior = 1), assim como o clado composto por *T. cf. serrulatus* e *T. aba* (*bootstrap* = 97, probabilidade posterior = 1). *T. stigmurus* se diversifica antes de *T. melici* em ambas as análises (Figura 2.7, Anexo 6).

Genealogia a partir de 16S

No resultado obtido por MV, populações partenogenéticas de *T. serrulatus* e *T. serrulatus* Ita formam um grupo monofilético (*bootstrap* = 77). Isso não é observado na árvore resultante de IB, uma vez que os indivíduos dessas populações encontram-se em politomia com o clado formado por *T. stigmurus* Par e *T. martinpaechi*, cujo suporte é alto (*bootstrap* = 99, probabilidade posterior = 1). O clado composto por *T. cf. serrulatus* e *T. aba* encontra-se bem sustentado. (*bootstrap* = 99, probabilidade posterior = 1) (Figura 2.8, Anexo 7). *T. stigmurus* se diversifica antes de *T. melici* em ambas as análises.

Genealogia a partir de ITS2

Para MV e IB, todos os exemplares de *T. stigmurus*, incluindo *T. stigmurus* Par, e *T. martinpaechi* apresentam-se em um único clado com alto suporte (*bootstrap* = 94, probabilidade posterior = 0,97). A análise de ML recupera, com baixo suporte (*bootstrap* = 47), o clado composto por *T. serrulatus* partenogenéticos e *T. serrulatus* Ita. Na análise de IB essas populações formam um grupo parafilético em relação a um clado formado pelas demais espécies do complexo. Em ambas as abordagens, *T. kuryi* e *T. melici* não se apresentam monofiléticos, assim como o clado formado por *T. aba* e *T. cf. serrulatus* (Figura 2.9, Anexo 8).

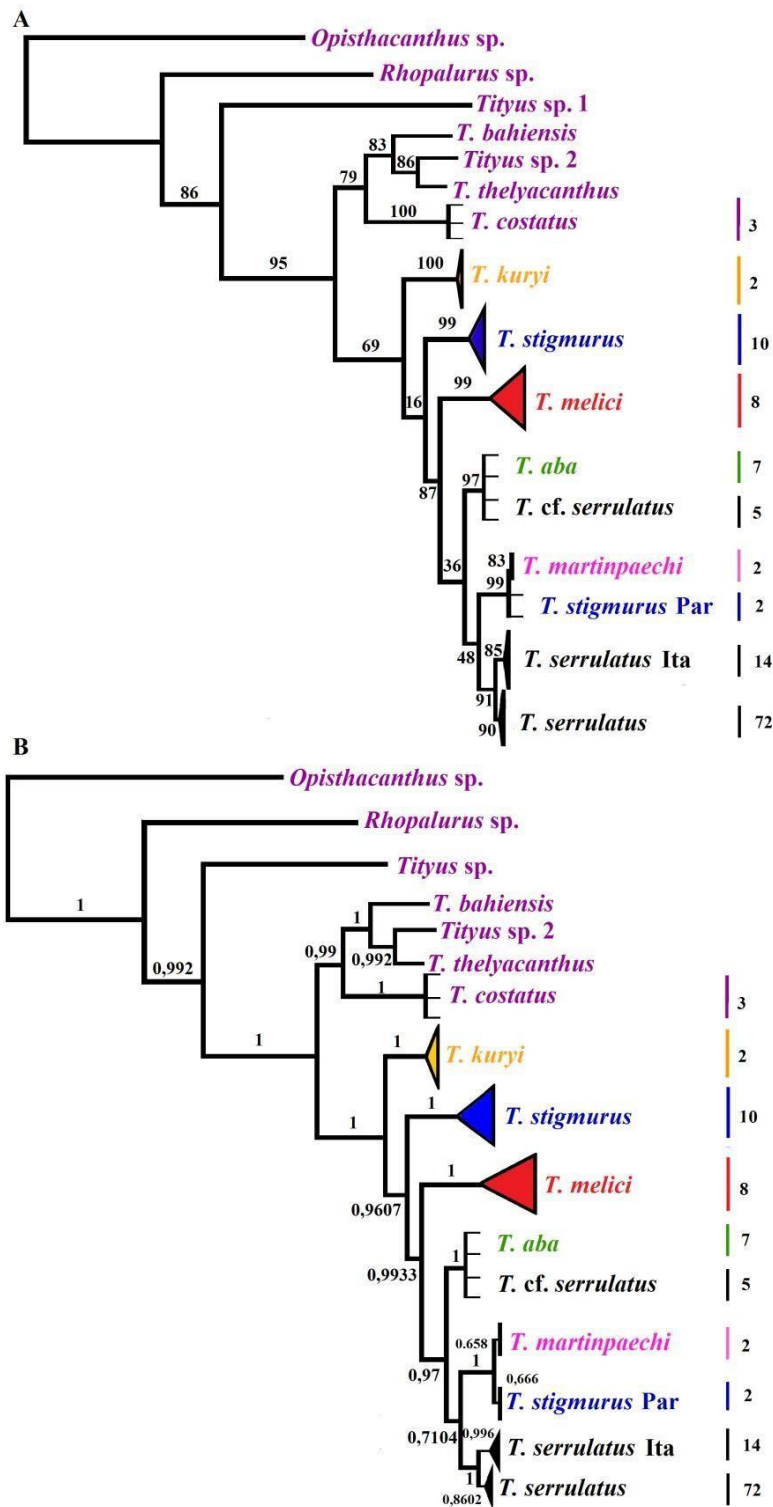


Figura 2.7: Árvore simplificada de Máxima Verossimilhança (A) e Inferência Bayesiana (B) para o gene mitocondrial COI. Números nos ramos representam valores de *bootstrap* e probabilidade posterior, respectivamente. Valores à direita representam o número de indivíduos de cada espécie presentes em politomia ou ramo colapsado.

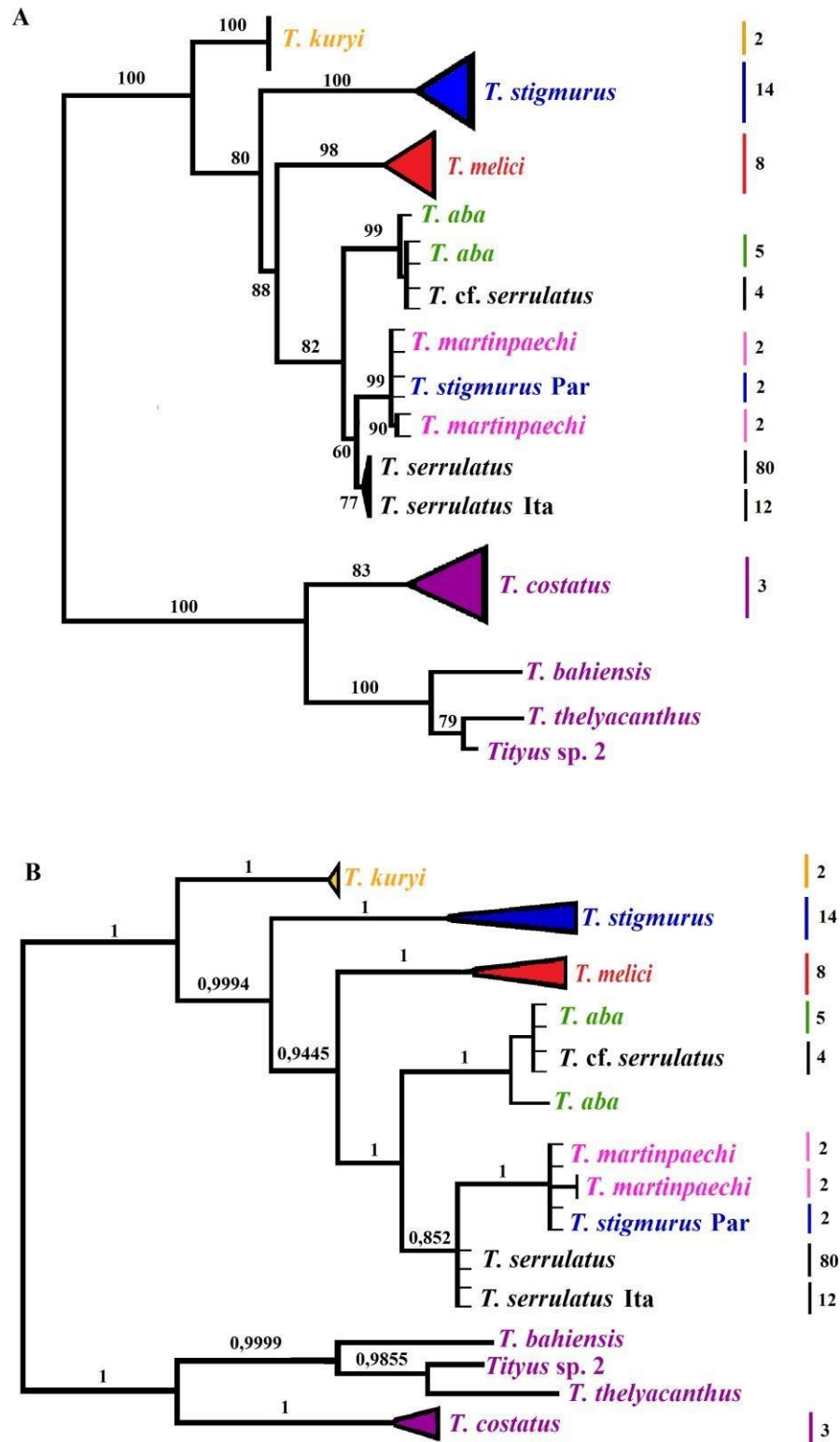


Figura 2.8: Árvore simplificada de Máxima Verossimilhança (A) e Inferência Bayesiana (B) para o gene mitocondrial 16S. Números nos ramos representam valores de *bootstrap* e probabilidade posterior, respectivamente. Valores à direita representam o número de indivíduos de cada espécie presentes em politomia ou ramo colapsado.

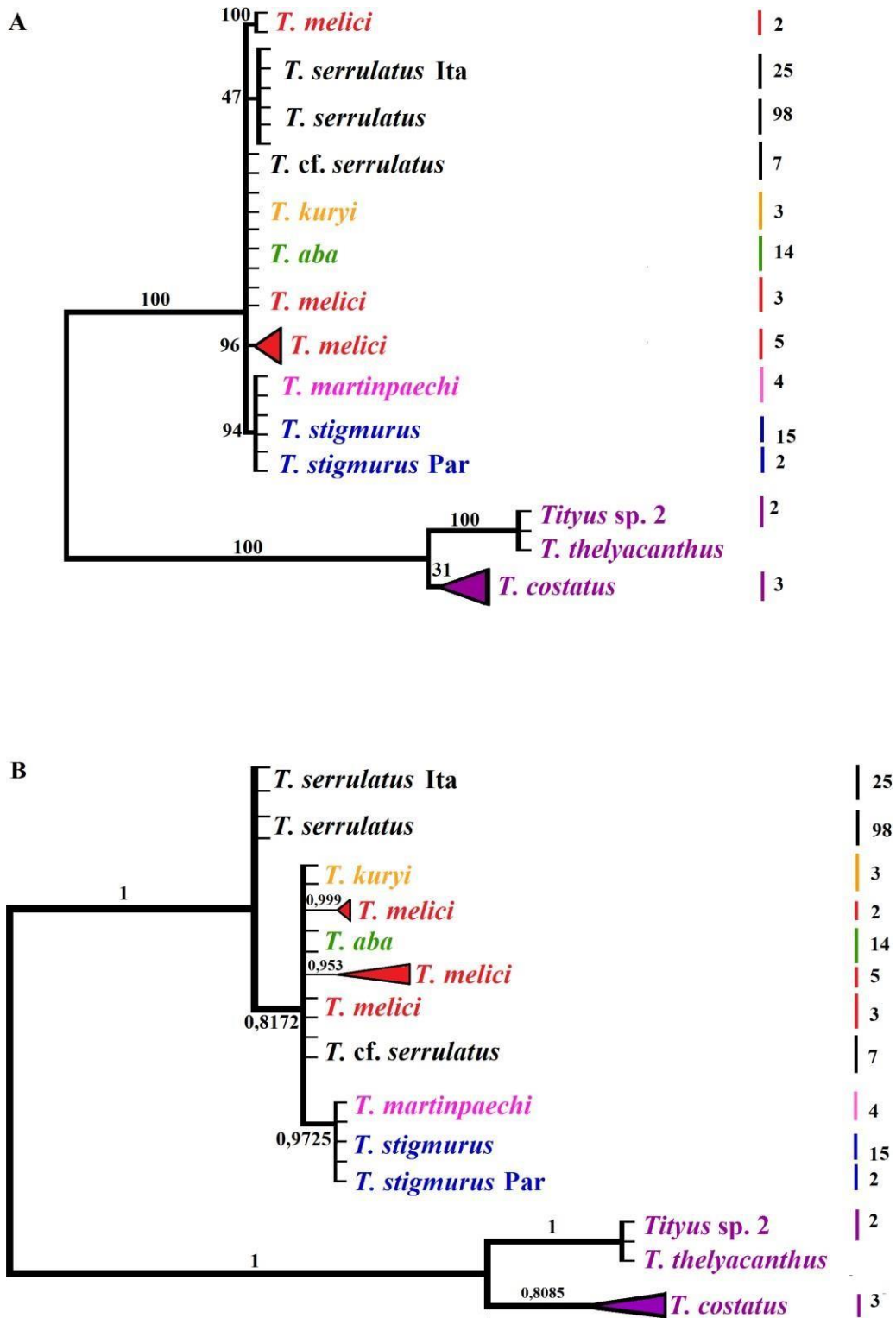


Figura 2.9: Árvore simplificada de Máxima Verossimilhança (A) e Inferência Bayesiana (B) para o gene nuclear ITS. Números nos ramos representam valores de *bootstrap* e probabilidade posterior, respectivamente. Valores à direita representam o número de indivíduos de cada espécie presentes em politomia ou ramo colapsado.

Análises concatenadas

A análise concatenada de genes mitocondriais para MV apresenta um clado formado por *T. stigmurus* Par e *T. martinpaechi* (bootstrap = 100) inserido dentro de um grupo formado por *T. serrulatus* partenogenéticos e *T. serrulatus* Ita, porém com suporte extremamente baixo (bootstrap = 18). Diferentemente, a análise de IB apresenta *T. serrulatus* partenogenéticos e *T. serrulatus* Ita em politomia com o clado *T. stigmurus* Par e *T. martinpaechi*, com probabilidade posterior igual a 0,96. O clado composto por *T. aba* e *T. cf. serrulatus* (bootstrap = 92, probabilidade posterior = 0,99) apresenta relações internas mais resolvidas se comparado com os genes analisados separadamente. *T. stigmurus* se diversifica depois de *T. melici* em ambas as análises (Figura 2.10, Anexo 9).

A análise concatenada dos três genes apresenta *T. serrulatus* partenogenéticos e *T. serrulatus* SI em um único clado para MV e IB (bootstrap = 79, probabilidade posterior = 1). As populações de *T. stigmurus* que se mantinham em um grupo monofilético nas demais análises, na IB apresentam-se em politomia. O clado composto por *T. aba* e *T. cf. serrulatus* (bootstrap = 87, probabilidade posterior = 0,73) também apresenta relações internas mais resolvidas. *Tityus stigmurus* se diversifica antes de *T. melici* em ambas as análises (Figura 2.11, Anexo 10).

Delimitação de espécies

A Hipótese 3 apresentou melhor resultado em relação às outras quatro hipóteses (Tabela 2.4). De acordo com a mesma, três espécies podem ser consideradas válidas dentro do complexo *T. stigmurus*: *T. kuryi* e *T. melici* são considerados linhagens separadas, enquanto que *T. aba*, *T. martinpaechi*, *T. serrulatus* e *T. stigmurus* estão unidos em um mesmo ramo da árvore de espécies.

A Hipótese 1, em que as seis espécies do complexo *T. stigmurus* representam linhagens separadas, foi a menos provável quando comparada com as demais hipóteses. Em seguida, encontra-se a Hipótese 2, em que apenas *T. stigmurus* e *T. serrulatus* são considerados a mesma espécie, tendo as demais como linhagens independentes. A Hipótese 4, em sequência, agrupa *T. aba* e *T. serrulatus* em uma mesma linhagem e *T. stigmurus* e *T. martinpaechi* em outra. Essa hipótese foi proposta a partir dos dados

obtidos nas análises de IB e MV, em que *T. cf. serrulatus* encontra-se agrupado com *T. aba* e *T. stigmurus* Par com *T. martinpaechi*. A Hipótese 5, a segunda a apresentar melhores valores, considera apenas duas espécies válidas, *T. kuryi*, e a demais agrupadas em uma única linhagem. Essa hipótese foi proposta devido à grande variação de coloração de *T. kuryi*, se comparada com as outras espécies do complexo.

Tabela 2.4: Hipóteses comparadas por AICM. Valores mais baixos de AICM indicam melhor ajuste da hipótese.

	Hipótese 1	Hipótese 2	Hipótese 3	Hipótese 4	Hipótese 5	AICM
Hipótese 1	-	-15,869	-191,379	-154,676	-175,309	8107,904
Hipótese 2	15,869	-	-175,51	-138,807	-159,44	8092,035
Hipótese 3	191,379	175,51	-	36,703	16,07	7916,525
Hipótese 4	154,676	138,807	-36,703	-	-20,633	7953,228
Hipótese 5	175,309	159,44	-16,07	20,633	-	7932,594

A árvore de espécies gerada a partir da Hipótese 3 apresenta *T. kuryi* como grupo irmão de *T. melici*, com probabilidade posterior de 89%. O clado formado por essas duas espécies emerge como grupo-irmão do ramo composto por *T. aba*, *T. martinpaechi*, *T. serrulatus* e *T. stigmurus*, com probabilidade posterior de 100% (Figura 2.12)

As três árvores de genes obtidas a partir da Hipótese 3, recuperaram, com altos valores de suporte, o monofiletismo de *T. kuryi* e *T. melici* (Anexos 11, 12 e 13). O clado formado por *T. cf. serrulatus* e *T. aba* e o clado formado por *T. serrulatus* partenogenéticos e *T. serrulatus* Ita foram recuperados nas árvores de 16S e ITS, mas o mesmo não é observado filogenia com o gene COI.

A árvore de COI apresenta dois indivíduos de *T. stigmurus* e dois exemplares de *T. aba* dentro do grupo composto por *T. serrulatus* partenogenético e *T. serrulatus* Ita, com probabilidade posterior de 100% (Anexo 11). A árvore de ITS2 agrupa, com probabilidade posterior de 99%, todos os *T. stigmurus*, incluindo *T. stigmurus* Par e *T. martinpaechi* em um único clado (Anexo 13). Nos demais genes, *T. martinpaechi* está agrupado apenas com *T. stigmurus* Par.

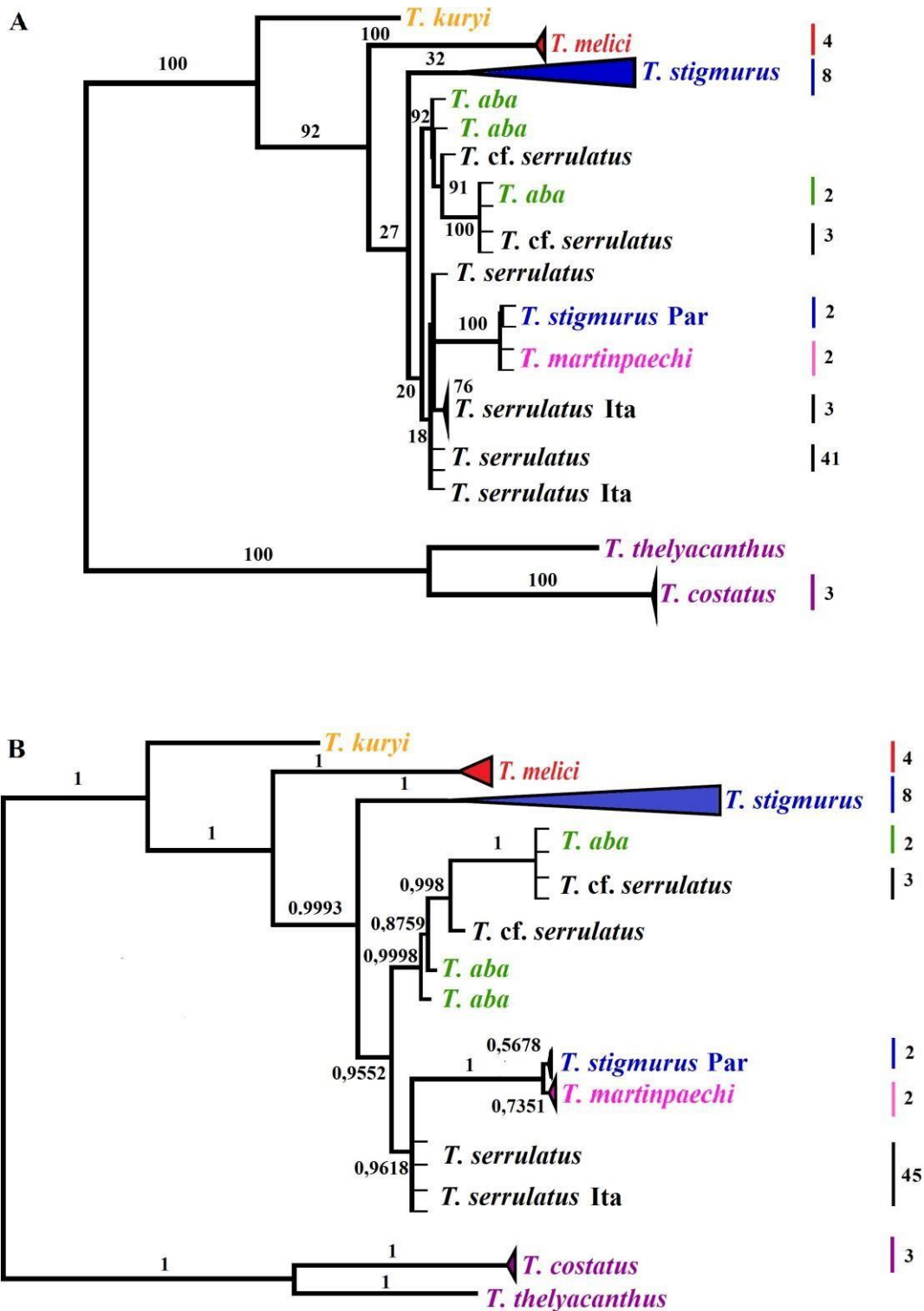


Figura 2.10: Árvore simplificada de Máxima Verossimilhança (A) e Inferência Bayesiana (B) para os genes mitocondriais COI e 16S concatenados. Números nos ramos representam valores de *bootstrap* e probabilidade posterior, respectivamente. Valores à direita representam o número de indivíduos de cada espécie presentes em politomia ou ramo colapsado.

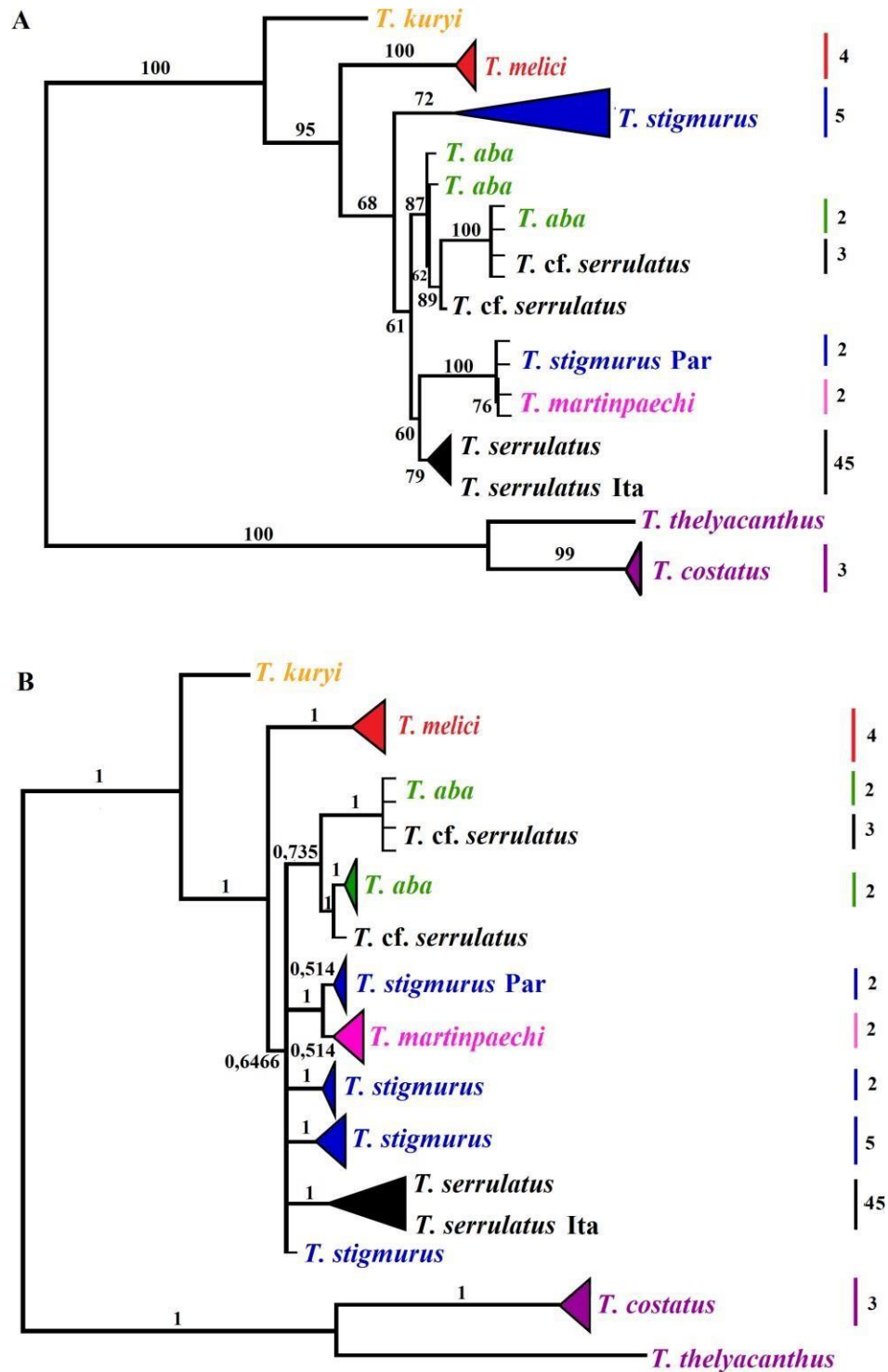


Figura 2.11: Árvore simplificada de Máxima Verossimilhança (A) e Inferência Bayesiana (B) para os genes mitocondriais COI e 16S e o gene nuclear ITS concatenados. Números nos ramos representam valores de *bootstrap* e probabilidade posterior, respectivamente. Valores à direita representam o número de indivíduos de cada espécie presentes em politomia ou ramo colapsado.

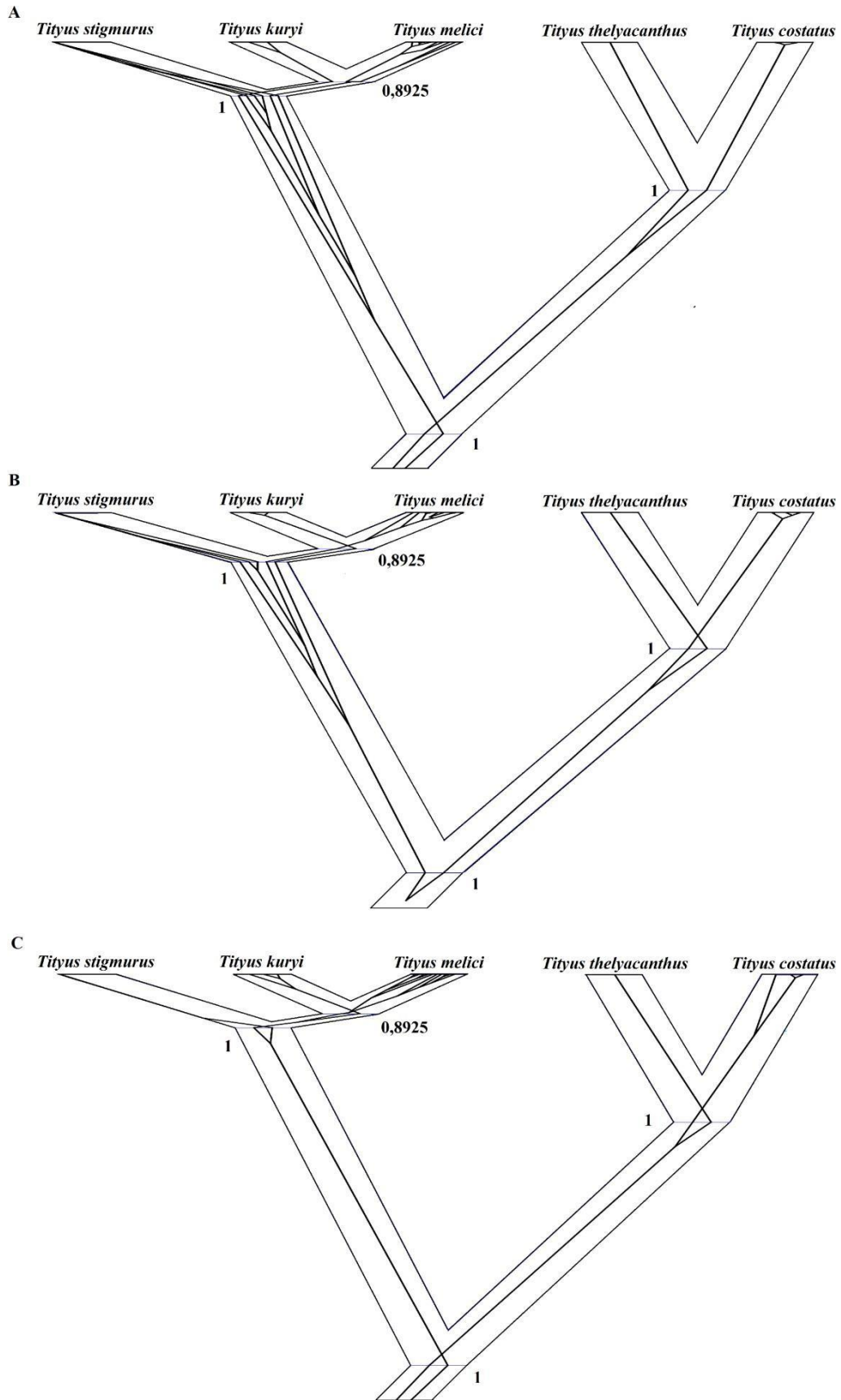


Figura 2.12: Árvores dos genes mitocondrial COI (A), mitocondrial 16S (B) e nuclear ITS2 (C) contidos na árvore de espécie. *Tityus stigmurus* engloba *T. aba*, *T. martinpaechi* e *T. serrulatus*. Valores nos nós representam a probabilidade posterior do clado.

DISCUSSÃO

A partir dos dados observados nas genealogias e na filogenia, o complexo *T. stigmurus* pode ser considerado monofilético, embora com baixo suporte na genealogia baseada no gene COI. As análises com esse gene foram as únicas nas quais o grupo externo apresenta indivíduos com maiores distâncias filogenéticas em relação ao complexo analisado (*Rhopalurus* sp. e *Opisthacanthus* sp.), situação que pode ter influenciado no baixo valor de suporte do complexo. As árvores de ITS2, apesar de também apresentarem o complexo como monofilético, fornecem poucas informações sobre as relações internas do mesmo. Isso ocorre porque genes nucleares, de evolução mais lenta que genes mitocondriais (Lina & Danforth 2003), apresentam poucos eventos de coalescência em grupos de especiação recente.

A árvore de espécies demonstra que *T. aba*, *T. martinpaechi*, *T. serrulatus* e *T. stigmurus* são variações morfológicas da mesma espécie, concordando com o que é apresentado nas genealogias, em que a ausência de monofiletismo recíproco pode ser observada entre essas linhagens. Porém, a árvore de espécies considera *T. kuryi* como grupo irmão de *T. melici*, ambos formando um clado irmão ao grupo *T. stigmurus* (aqui representado as quatro espécies restantes). As genealogias indicam que o grupo *T. stigmurus* é irmão de *T. melici*, e este clado é irmão de *T. kuryi*.

A abordagem utilizada nesse trabalho considera apenas a separação incompleta de linhagens como causa das discordâncias encontradas entre as genealogias e a filogenia (conforme Knowles & Carstens 2007). Porém, a hibridação também pode causar essa discordância (Maddison 1997). Em algumas circunstâncias, o polimorfismo ancestral pode ser confundido com eventos de fluxo gênico mitocondrial (Morando *et al.* 2004, McGuire *et al.* 2007). A classificação de um híbrido está diretamente associada a indivíduos com características morfológicas intermediárias entre as espécies parentais (Hubbs 1955). Apesar de Souza *et al.* (2009) descreverem as espécies do complexo como de fácil identificação e Santos *et al.* (2014) apresentarem uma chave de identificação para as espécies do grupo, é perceptível a existência de morfótipos intermediários entre as espécies do complexo *T. stigmurus*, exceto entre *T. kuryi* e as demais espécies. *T. kuryi* apresenta características morfológicas bem distintas, como coloração marrom avermelhada variando de escura ao negro (Almeida 2010) Anexo 14. Um exemplo desses morfótipos são os indivíduos de *T. cf serrulatus*, cujas características morfológicas são intermediárias a *T. melici* e *T. serrulatus*. Talvez a

diferença da posição filogenética de *T. melici* nas árvores de gene e na árvore de espécie seja um caso de hibridação.

Indivíduos com características intermediárias podem ser constatados através da história taxonômica do complexo. Por exemplo, *T. lamottei* foi descrito por Lourenço (1981) como espécie distinta de *T. serrulatus* apenas por apresentar manchas nos pedipalpos e nas pernas. Souza *et al.* (2009) distinguem *T. stigmurus* de *T. martinpaechi* pelo primeiro apresentar um única listra escura longitudinal e central sobre os tergitos, carapaça com um triângulo invertido na região anterior e menor comprimento do corpo, enquanto o segundo possui três listras longitudinais sobre os tergitos, carapaças com algumas manchas escuras e maior comprimento do corpo. Almeida (2010) afirma que *T. martinpaechi* apresenta um triângulo invertido na carapaça em meio a manchas escuras e *T. stigmurus* pode apresentar listras laterais longitudinais interrompidas sobre os tergitos. Além disso, observações de indivíduos analisados nessa dissertação demonstram variações em relação a algumas descrições morfológicas encontradas na literatura. Um exemplo disso é uma fêmea de *T. aba* (Anexo 15), coletado em Catolés, Bahia, que apresenta pequenas manchas nas pernas e pedipalpo, nunca apontadas antes para a espécie (Candido *et al.* 2005, Souza *et al.* 2009, Santos *et al.* 2014). Outros exemplos intermediários serão citados durante a discussão.

Clado *T. stigmurus* Par e *T. martinpaechi*

Os indivíduos de *T. stigmurus* Par apresentam características típicas dessa espécie, com uma única listra central sobre os tergitos, triângulo invertido na carapaça bem delimitado e tamanho pequeno, aproximadamente 55cm (Anexo 16). Porém, nas genealogias, esses indivíduos encontram-se sempre agrupados com *T. martinpaechi*. Essa espécie foi descrita a partir de indivíduos coletados no Ceará, onde se encontram populações com características marcantes do grupo como, por exemplo, manchas bem evidentes nos apêndices (Figura 2.2D). Os espécimes desse trabalho foram coletados em uma área residencial em Miguel Calmon (Bahia) e apresentam manchas pouco evidentes nas pernas e pedipalpos (Anexo 17). A genealogia obtida a partir de ITS2 mostra que todos os *T. stigmurus*, incluindo a população de Paripiranga, juntamente com *T. martinpaechi*, emergem em um grupo monofilético. Os genes mitocondriais demonstram que essas duas espécies estão em processo de especiação e ainda não

atingiram o monofiletismo recíproco. É provável que este seja um caso de polimorfismo ancestral, que pode ser comum principalmente em espécies de divergência recente e tamanho efetivo da população efetivamente grande (Azevedo 2012). *T. martinpaechi* e *T. stigmurus* ocupam grandes regiões geográficas do nordeste brasileiro (Almeida 2010 — Figuras 2.4B e 2.4D), sendo que a distribuição da última vem crescendo rapidamente nos últimos anos (Ross 2010).

Clado *T. cf. serrulatus* e *T. aba*

Os espécimes denominados por *T. cf. serrulatus* possuem características morfológicas semelhantes a *T. serrulatus*, mas também apresentam caracteres similares a algumas populações de *T. melici*. Porém, dados mitocondriais e dados concatenados apresentam *T. cf. serrulatus* agrupado com *T. aba*, ambas as espécies da mesma localidade, Contendas do Sincorá, Bahia. Todavia, a coloração das duas espécies é muito diferente em relação aos padrões de delimitação morfológica do complexo, o que permite a fácil distinção entre os dois morfótipos. *T. cf. serrulatus* apresenta o tergito escurecido (Anexo 18), enquanto *T. aba* possui as três listras longitudinais bem visíveis (Anexo 19). Embora essa divergência possa ser explicada por polimorfismo ancestral, devido ao fato de ambas as espécies terem sido encontradas na mesma localidade (Contendas do Sincorá, Bahia), é possível também que tenha ocorrido introgressão mitocondrial entre essas linhagens. Um fato que sustenta essa última hipótese é que o gene ITS2 não agrupa essas duas espécies, estando elas em politomia com *T. melici* e *T. Kuryi*. Essa dúvida pode ser esclarecida com o emprego de mais marcadores nucleares (Avice 2000).

T. cf. serrulatus* e *T. melici

Na descrição de *T. melici*, Lourenço (2003) afirma que os indivíduos dessa espécie não possuem grânulos modificados em espinhos no metassoma (Figuras 2.13A e 2.13B), e que, apesar da grande semelhança morfológica (Lourenço & Cloudsley-Thompson 1999), podem ser facilmente diferenciados de *T. serrulatus* por essa característica. Contudo, Souza *et al.* 2009 afirmam que fêmeas dessa espécie, encontradas em Minas Novas, Minas Gerais, apresentam grânulos espiniformes, ainda

que reduzidos quando comparados a outros membros do complexo. *T. serrulatus*, apesar de descrito em alguns trabalhos (Souza *et al.* 2009, Santos *et al.* 2014) com pelo menos cinco grânulos espiniformes entre o quarto e quinto segmentos do metassoma (geralmente dois grânulos espiniformes no terceiro e três grânulos no quarto segmentos, Figuras 2.13C e 2.13D), alguns indivíduos podem apresentar apenas dois grânulos entre esses dois segmentos (Lourenço & Cloudsley-Thompson 1999: Figura 2.13E). Os espécimes de *T. cf. serrulatus* apresentam dois grânulos espiniformes bem desenvolvidos, um no terceiro e outro no quarto segmentos do metassoma (Figura 2.13F), padrão semelhante ao apresentado por *T. martinpaechi* (Figura 2.13G) e *T. aba* (Figura 2.13H). Esse caráter, apesar de não sinapomórfico, sustenta o grupo formado por *T. cf. serrulatus* e *T. aba* obtido nos resultados das análises filogenéticas obtidas nessa dissertação.

T. melici apresenta os pedipalpos mais delgados e compridos que *T. serrulatus* (Souza *et al.* 2009) e geralmente possui um número maior de dentes nos pécens (22-27), enquanto que *T. serrulatus* apresenta um número menor (21-25) (Almeida 2010). *T. cf. serrulatus* possui pedipalpos um pouco mais robustos (Anexo 18), distintos dos espécimes de *T. melici* analisados nesse trabalho (Anexo 20), e uma média de 24 dentes nos pécens. Esse valor está mais próximo da média observada em espécimes de *T. aba* estudados nessa dissertação (25), podendo este ser mais um caráter morfológico que sustenta o grupo formado por essa espécie e *T. cf. serrulatus* observados nas análises filogenéticas.

Lourenço & Cloudsley-Thompson (1999), quando descreveram a população sexuada de *T. serrulatus*, posteriormente considera como pertencente a *T. melici* (Souza *et al.* 2009), afirmaram que os filhotes dessa população apresentavam grânulos espiniformes, que são perdidos nos adultos. Aliado a essa informação e à identificação das fêmeas de Minas Novas, Minas Gerais, como *T. melici*, a diferenciação morfológica entre essa espécie e *T. serrulatus* torna-se mais complexa do que o sugerido pelas informações contidas na literatura. Se no presente trabalho *T. cf. serrulatus* for considerado *T. melici*, o monofiletismo da espécie, observado nos resultados, será perdido. Desconsiderar *T. cf. serrulatus* como pertencente a *T. serrulatus* não necessariamente torna essa espécie monofilética nas análises, uma vez que *T. serrulatus* partenogênicos e *T. serrulatus* Ita apresentam-se em politomia em algumas árvores (Figuras 2.8A, 2.9B, 2.10A, 2.10B).

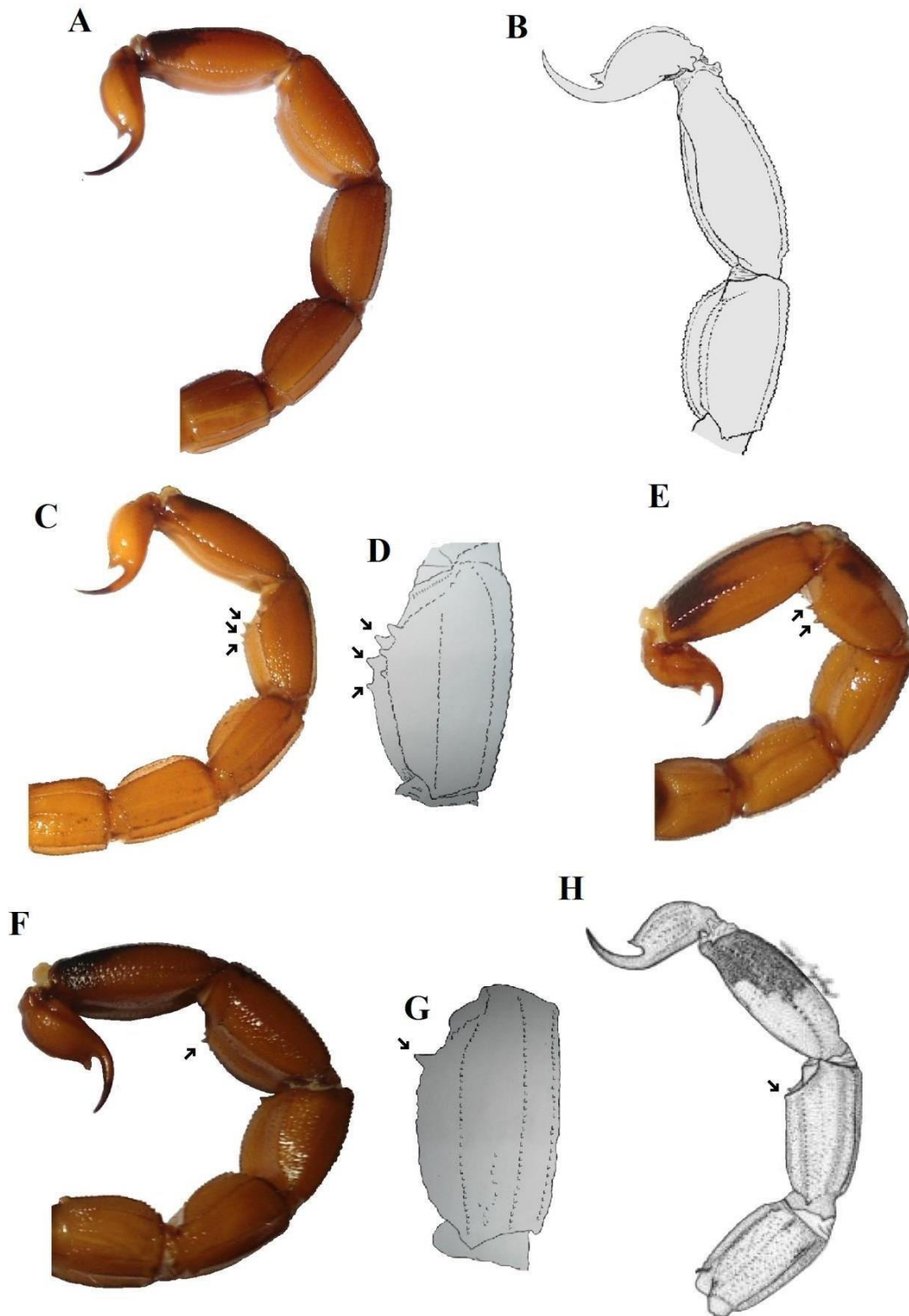


Figura 2.13: Grânulos espiniformes em metassoma de representantes do complexo *Tityus stigmurus*. A- *T. melici*, macho UFMG15120. B- *T. melici*, modificado de Lourenço 2003. C- *T. serrulatus* partenogenético, fêmea UFMG12039. D- *T. serrulatus*, modificado de Lourenço 2001. E- *T. serrulatus* sexuado, fêmea UFMG5357 F- *T. cf. serrulatus*, fêmea UFMG17556. G- *T. martinpaechi* modificado de Lourenço 2003. H- *T. aba*, modificado de Candido *et al.* 2005. Setas apontam para os grânulos.

***T. serrulatus* partenogéticos e *T. serrulatus* Ita**

As populações partenogéticas de *T. serrulatus* e a população sexuada *T. serrulatus* Ita apresenta-se agrupadas em várias análises, apesar de encontrarem-se em politomia com outras espécies em algumas genealogias. As características morfológicas desses dois grupos são praticamente idênticas, sustentando o clado (Anexo 21). Porém, o gene COI apresenta as populações sexuadas em monofiletismo recíproco com o grupo formado pelas populações partenogéticas. Essas populações são idênticas em relação aos fragmentos moleculares analisados nessa dissertação, apresentando apenas um sítio variante no gene COI, que não possui nenhuma informação geográfica da distribuição dos indivíduos. Como o gene COI evolui mais rápido que o 16S (Chenuil 2006), espera-se que essas duas linhagens estejam em processo de especiação.

Diversificação do complexo e Partenogênese

Lourenço & Cloudsley-Thompson (1996) sugerem que há uma zona de hibridação de *T. serrulatus* e *T. stigmurus* e que esta ainda pode existir no estado da Bahia. Populações sexuadas de *T. serrulatus* são conhecidas de Itacarambi, norte de Minas Gerais (Souza *et al.* 2009) e São Desiderio, oeste da Bahia (Santos *et al.* 2014). A distribuição dessas populações sexuadas sugere que a partenogênese no escorpião amarelo pode ter surgido entre essas regiões. Esses fatores, juntamente com os resultados observados nesse trabalho, parecem demonstrar que o complexo *T. stigmurus* surgiu e se diversificou na região central do Brasil, e que ainda pode haver uma zona de hibridação entre as espécies.

Se existem linhagens dentro do complexo que sofreram introgressão durante sua história evolutiva, esse fator pode explicar o surgimento da partenogênese em *T. serrulatus* e *T. stigmurus*. A partenogênese pode surgir em animais por diferentes modos, como origem espontânea, indução por microrganismos e hibridação (Simon *et al.* 2003). A hibridação entre espécies pode interromper processos meióticos e criar oportunidades para a seleção de processos citológicos que resgatem a produção de ovos (Vrijenhoek 1998). Essa forma de partenogênese resulta de cruzamentos entre duas espécies bissexuais e geralmente leva à produção de linhagens diplóides. Sabe-se que fêmeas partenogéticas de *T. serrulatus* possuem o número diplóide $2n = 12$

(Schneider & Cella 2010), porém estudos mais detalhados de citogenética podem ajudar a esclarecer o surgimento da partenogênese nessas espécies.

Geralmente, na presença de alterações ambientais, organismos partenogenéticos podem dominar grandes áreas geográficas, mas também são sensíveis à continuação dessa modificação no ambiente (Schön *et al.* 2009). As consequências evolutivas desse modo de reprodução podem envolver linhagens com baixa diversidade genotípica, como observado em *T. serrulatus*, e, conseqüentemente, essas linhagens podem ocupar os nós terminais de árvores filogenéticas (Simon *et al.* 2003). Porém, se a linhagem cresce rapidamente em número de indivíduos e obtém sucesso ao estabelecer um nicho adequado, é provável que a mesma se estabeleça por um período de tempo evolutivo considerável (Schön *et al.* 2009). *T. serrulatus* parece ser uma linhagem bem sucedida, uma vez que sua distribuição vem crescendo rapidamente em áreas urbanas (Lourenço 2008).

Bioquímica do veneno

Becerril *et al.* (1996, 1997) analisou a estrutura primária de algumas toxinas presentes no veneno de *T. bahiensis*, *T. serrulatus* e *T. stigmurus* e concluiu que as três espécies têm venenos idênticos em relação a indução de soro em cavalos, porém as toxinas das duas últimas são mais próximas do ponto de vista bioquímico. Lourenço (2001) analisou os resultados encontrados por Becerril *et al.* (2006), em conjunto com resultados obtidos por Corona *et al.* (1996), que sequenciou uma região genômica que codifica algumas proteínas do veneno de *T. serrulatus*. Após a comparação das sequências, Lourenço (2001) afirma que, por esse ponto de vista, que *T. serrulatus* e *T. stigmurus* são espécies distintas, porém em processo de especiação. Essa afirmação é baseada no fato de haver 28 nucleotídeos diferentes entre *T. stigmurus* e *T. serrulatus*, numa sequência com o total de 790 nucleotídeos, enquanto que dois nucleotídeos são diferentes quando sequências de *T. serrulatus* são comparadas. Os resultados obtidos nessa dissertação mostram que apenas um nucleotídeo varia numa sequência concatenada composta por 1098 aminoácidos entre populações de *T. serrulatus* partenogenéticos, sendo essa variação muito maior quando comparado diferentes populações de *T. stigmurus* (aproximadamente 100 sítios). Isso demonstra que a

variação de sítios em *T. serrulatus* partenogênicos é muito baixa e que o critério de comparação usado por Lourenço (2001) não indica que as espécies são diferentes.

Nascimento *et al.* (2006) utilizou a composição do veneno de *T. serrulatus* e *T. stigmurus* e demonstrou que as duas espécies são muito semelhantes do ponto de vista bioquímico, afirmando que seus resultados confirmam a divisão em grupos baseado na coloração, proposta por Lourenço (2001). Conforme os dados do presente estudo, *T. aba* e *T. martinpaechi* também estão próximos dessas duas espécies, havendo a possibilidade do veneno ter o mesmo nível de toxicidade. Estudos baseados em compostos bioquímicos do veneno são necessários para avaliar se essas espécies também são animais de importância médica.

Considerações finais

Uma característica importante, que pode sustentar *T. aba*, *T. stigmurus*, *T. serrulatus* e *T. martinpaechi* como uma única espécie, é a presença de manchas nos pedipalpos e pernas das espécies do complexo. Apesar das três primeiras serem descritas com ausência de manchas nos apêndices (Souza *et al.* 2009), os filhotes possuem manchas. Estas vão desaparecendo aos poucos, à medida que o escorpião vai atingindo a fase reprodutiva, podendo permanecer resquícios principalmente nos pedipalpos.

A coloração e características de granulação do tegumento não parecem ser informações confiáveis para a delimitação de *T. aba*, *T. martinpaechi*, *T. serrulatus* e *T. stigmurus* como espécies distintas. Elas possuem genealogias muito próximas e ainda não atingiram o monofiletismo recíproco, podendo ser sinonimizadas. Para confirmação dessa hipótese, outras abordagens para delimitação precisam ser testadas. Além disso, o número amostral de algumas espécies precisa ser aumentado, bem como a incorporação de novos genes nas análises. Evidências morfológicas e moleculares indicam que *T. kuryi* pode ser considerado uma espécie válida. Apesar de *T. melici* apresentar-se como monofilético em relação a genes de evolução mais rápida, características morfológicas não são suficientes para a identificação dessa espécie.

Uma vez que *T. serrulatus* e *T. stigmurus* são causadores de acidentes graves no Brasil, *T. aba* e *T. martinpaechi* possuem um potencial para também serem animais de

importância médica. Além disso, o uso de soro produzido através do veneno de uma dessas espécies provavelmente pode ser aplicado em acidentes com as demais, uma vez que esses indivíduos são muito semelhantes do ponto de vista molecular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida R.B. (2010) **Atlas das espécies de *Tityus* C. L. Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae) do Brasil.** Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo.

Avice J.C. (2000) **Phylogeography: the history and formation of species.** *Harvard University Press* Cambridge

Avice J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A., Saunders N.C. (1987) **Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics.** *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489–522

Azevedo G.H.F. (2012) **Sistemática e Evolução de Aranhas-Armadeiras (Ctenidae: *Phoneutria*) a partir de evidências moleculares, morfológicas e ecológicas.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais

Becerril B., Corona M., Coronas F., Zamudio F., Calderon-Aranda E., Fletcher P. L., Possani L. (1996) **Toxic peptides and genes encoding toxin gamma of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*.** *Biochemical Journal* 313: 753-760

Becerril B., Marangoni S., Possani L.D. (1997) **Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*.** *Toxicon* 35(6):821–835

Candido D.M., Lucas S.M., Souza C.A.R., Diaz D., Lira da Silva R.M. (2005) **Uma nova espécie de *Tityus* C.L. Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae) do estado da Bahia, Brasil.** *Biota Neotropica* 5 (no.1A) – <http://www.biotaneotropica.org.br/v5n1a/pt/abstract?taxonomic-review+bn020051a2005>

- Carstens B.C. & Dewey T.A. (2010) **Species delimitation using a combined coalescent and information-theoretic approach: an example from North American *Myotis* bats.** *Systematic biology* 59: 400-414
- Chenuil A. (2006) **Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects.** *Genetica* 127: 101–120
- Corona M., Zurita M., Possani L.D, Becerril B. (1996) **Cloning and characterization of the genomic region encoding toxin IV-5 from the scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello.** *Toxicon* 34 (2): 251-256
- de Queiroz K. (2007) **Species concepts and species delimitation.** *Systematic Biology* 56: 879-886
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. (2012) **jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing.** *Nature Methods* 9: 772
- Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D., Rambaut A. (2012) **Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7.** *Molecular Biology and Evolution* 29(8): 1969-1973
- Edgar R.C. (2004) **MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput.** *Nucleic Acids Research* 32: 1792–1797
- Ewing B., Hillier L., Wendl M.C., Green P. (1998) **Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment.** *Genome Research* 8: 175 185
- Fet V., Sissom W.D., Lowe G., Braunwalder M.E. (2000) **Catalog of the Scorpions of the World (1758-1998).** *New York Entomological Society* New York.
- Fujita M.K., Leache A.D., Burbrink F.T., McGuire J.A., Moritz C. (2012) **Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy.** *Trends in Ecology & Evolution* 27(9): 480-488.
- Gantenbein B., Largiader C.R. (2003) **The phylogeographic importance of the Strait of Gibraltar as a gene flow barrier in terrestrial arthropods: a case study**

with the scorpion *Buthusoccitanus* as model organism. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28: 119-130

Gordon D., Abajian C., Green P. (1998) **Consed: a graphical tool for sequence finishing.** *Genome Research* 8: 195–202.

Hubbs C.L. (1955) **Hybridization between fish species in nature.** *Systematic Zoology* 4: 1-20.

Isaac N.J.B., Mallet J., Mace G.M. (2004) **Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation.** *Trends in Ecology and Evolution* 19: 464-469

Karl S.A., Bowen B.W. (1999) **Evolutionary significant units versus geopolitical taxonomy: molecular systematic of an endangered sea turtle (genus *Chelonia*).** *Conservation Biology* 13: 990-999

King G.F., Gentz M.C., Escoubas P., Nicholson G.M. (2008) **A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals.** *Toxicon* 52: 264-276

Knowles L.L. & Carstens B.C. (2007) **Delimiting species without monophyletic gene trees.** *Systematic Biology* 56(6): 887-895

Kraepelin K. (1899) **Scorpiones und Pedipalp.** *Das Tierreich* Lief. 8:1-265

Lina C.P. & Danforth B.N. (2004) **How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets.** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 686–702

Lourenço W.R. (1981) **Sur la systématique des scorpions appartenant au complexe *Tityus stigmurus* (Thorell, 1877) (Buthidae).** *Revista Brasileira de Biologia* 41: 351–362

Lourenço W.R. (1997) **A propos de deux nouvelles espèces de *Tityus* Koch du Brésil (Scorpiones, Buthidae).** *Revue Arachnologique* 12(5): 53–59

- Lourenço W.R. (2001) **The Brazilian scorpion *Tityus stigmurus* (Chelicerata, Buthidae) and its complex of morphos. A new model is needed.** *Biogeographica* 77(1): 21-34
- Lourenço W.R. (2003) **Description of a new species of *Tityus* (Scorpiones, Buthidae) from Serra da Jurema in the State of Bahia, Brazil.** *Revista Ibérica de Aracnología* 7: 109–115
- Lourenço W.R. (2006) **Nouvelle proposition de découpage sous-générique du genre *Tityus* C. L. Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae).** *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa* 39: 55–67
- Lourenço W.R. & Cloudsley-Thompson J.L. (1996) **Effects of human activities on the environment and the distribution of dangerous species of scorpion.** In: Bon C. & Goyffon M. (Eds.) *Envenomings and their treatments. Editions Foundation Marcel Mérieux* Lyon. Pp. 49–60.
- Lourenço W.R. & Cloudsley-Thompson J.L. (1999) **Discovery of a sexual population of *Tityus serrulatus*, one of the morphs within the complex *Tityus stigmurus* (Scorpiones, Buthidae).** *Journal of Arachnology* 27: 154–158
- Lourenço W.R., Cloudsley-Thompson J.L., Cuellar O., Eickstedt V.V., Barraviera B., Knox M.B. (1996) **The evolution of scorpionism in Brazil in recent years.** *Journal of Venomous Animals and Toxins* 2(2): 121-134
- Lourenço W.R., da Silva E.A. (2006) **A reappraisal of the geographical distribution of the complex *Tityus confluens* Borelli, 1899 (Scorpiones, Buthidae) with the description of a new species.** *Entomologische Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum Hamburg* 14(174): 307-320
- Lutz A. & Mello O. (1922) **Cinco novos escorpiões brasileiros dos gêneros *Tityus* e *Rhopalurus*.** *Folha Médica* 3(6): 25-26
- Maddison W.P. (1997) **Gene trees in species trees.** *Systematic Biology* 46: 523-536
- Maddison W.P., Maddison D.R. (2011) **Mesquite: a modular system for evolutionary analysis.** Version 2.74. Disponível em: <http://mesquiteproject.org>
- Mayr E. (1997) **Populações, espécies e evolução.** *Edusp*, São Paulo

- McGuire J.A., Linkem C.W., Koo M.S., Hutchison D.W., Lappin A.K., Orange D.I., Lemos-Espinal J.A., Riddle B.R., Jaeger J.R. (2007) **Mitochondrial introgression and incomplete lineage sorting through space and time: phylogenetics of crotaphytid lizards.** *Evolution* 61: 2879–2897
- Mello-Leitão C. (1933) **Duas novas espécies de *Tityus* do Brasil.** *Annaes da Academia Brasileira de Ciências* 5(4): 201–203
- Mello-Leitão C. (1939) **Revisão do gênero *Tityus*.** *Physis* 17: 57–76
- Mello-Leitão C.de. (1945) **Escorpiões sul-americanos.** *Arquivos do Museu Nacional* 40: 7–468.
- Miller M.A., Pfeiffer W., Schwartz T. (2010) **Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees.** IN: Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans, LA
- Morando M., Avila L.J., Baker J., Sites J. W. (2004) **Phylogeny and phylogeography of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae): evidence for introgression and incomplete lineage sorting.** *Evolution* 58: 842–861
- Nascimento D.G., Rates B., Santos D.M., Verano-Braga T., Barbosa-Silva A., Dutra A.A., Pimenta A.M. (2006). **Moving pieces in a taxonomic puzzle: venom 2D-LC/MS and data clustering analyses to infer phylogenetic relationships in some scorpions from the Buthidae family (Scorpiones).** *Toxicon* 47(6): 628-639
- Rambaut A. (2012) **FigTree, version 1.4.0.** (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/Pgtree/>)
- Ronquist F., & Huelsenbeck J. P. (2003) **MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models.** *Bioinformatics* 19(12): 1572-1574
- Ross L.K. (2010) **Confirmation of parthenogenesis in the medically significant, synanthropic scorpion "*Tityus stigmurus*" (Thorell, 1876) (Scorpiones: Buthidae).** *Revista Ibérica de Aracnología* 18: 115-121
- Ross K.G., Gotzek D., Ascunce M.S., Shoemaker D.D. (2009). **Species delimitation: a case study in a problematic ant taxon.** *Systematic Biology* 59(2):162-184
- Santos M.D.S., Porto T.J., Lira-da-Silva R.M., Brazil T.K. (2014) **Description of the male of *Tityus kuryi* Lourenço, 1997 and notes about males of *Tityus***

stigmurus (Thorell, 1877) and *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae). *ZooKeys* 435: 49-61

Schneider M.C. & Cella D.M. (2010) **Karyotype conservation in 2 populations of the parthenogenetic scorpion *Tityus serrulatus* (Buthidae): rDNA and its associated heterochromatin are concentrated on only one chromosome.** *Journal of Heredity* 101(4): 491–496

Schön I., Martens K., Van Dijk P. (Eds.) (2009) **Lost sex. The Evolutionary Biology of Parthenogenesis.** Springer, Dordrecht

Senff-Ribeiro A., da Silva P.H., Chaim O.M., Gremski L.H., Paludo K.S., da Silveira R.B., Gremski W.O., Mangili C., Veig S.S. (2008) **Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins.** *Biotechnology Advances* 26: 210-218

Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P. (1994) **Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers.** *Annals of the Entomological Society of America* 87: 151-701

Simon J.C., Delmotte F., Rispe C., Crease T. (2003) **Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: the possible routes to parthenogenesis in animals.** *Biological Journal of the Linnean Society* 79(1): 151-163

Sites J.W. & Marshall J.C. (2003) **Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology.** *Trends in Ecology and Evolution* 18: 462-470

Souza C.A.R., Candido D.M., Lourenço W.R. (2006) **Description of the male of *Tityus martinpaechi* Lourenço, 2001 (Scorpiones, Buthidae).** *Zootaxa* 1260: 27–35

Souza C.A.R., Candido D.M., Lucas S.M., Brescovit A.D. (2009) **On the *Tityus stigmurus* complex (Scorpiones, Buthidae).** *Zootaxa* 1987: 1–38

- Stamatakis A. (2006) **RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models.** *Bioinformatics* 22(21): 2688-2690
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S. (2013) **MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0.** *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725-2729
- Tanaka H., Roubik D.W., Kato M., Liew F., Gunsalam G. (2001) **Phylogenetic position of *Apis nuluensis* on northern Borneo and phylogeography of *A. cercana* as inferred from mitochondrial DNA sequences.** *Insectes Sociaux* 48: 44–51
- Thorell T. (1877) **Etudes scorpiologiques.** *Atti Della Società Italiana di Scienze Naturali* 19:75–272
- Vellard J. (1932) **Scorpions. In Mission scientifique au Goyazetau Rio Araguaia.** *Mémoires de La Société Zoologique de France* 29(6): 539–556
- Vetter R.S. & Isbister G.K. (2008) **Medical aspects of spider bites.** *Annual Review of Entomology* 53: 409-429.
- Vrijenhoek R.C. (1998) **Animal clones and diversity.** *Bioscience* 48: 617-628
- Wheeler Q.D. & Platnick N.I. (2000) **The phylogenetic species concept (sensu Wheeler & Platnick).** In: Wheeler Q.D. & Meier R. (Eds.) *Species concepts and phylogenetic theory: a debate* Columbia University Press, New York. Pp: 55-69.
- White T.J., Bruns T., Lee S.J.W.T., Taylor J.W. (1990) **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.** In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (Eds.) *PCR protocols: a guide to methods and applications* Academic Press, New York. Pp. 315–322
- Wiens J.J. (2007) **Species delimitation: new approaches for discovering diversity.** *Systematic Biology* 56(6), 875-878

ANEXOS

Anexo 1: Lista dos espécimes de escorpiões utilizados para detecção de *Wolbachia*. Números com asterisco indicam espécimes cujo tecido reprodutor foi utilizado para extração de DNA.

Lote	Identificação	UF	Localidade	Latitude	Longitude
UFMG 12524	<i>T. cf. serrulatus</i>	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205
UFMG 17552	<i>T. cf. serrulatus</i>	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205
UFMG 17553	<i>T. cf. serrulatus</i>	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205
UFMG 4071*	<i>T. serrulatus</i>	MG	Belo Horizonte	-19.9167	-43.9333
UFMG 4072	<i>T. serrulatus</i>	MG	Belo Horizonte	-19.9167	-43.9333
UFMG 4073	<i>T. serrulatus</i>	MG	Belo Horizonte	-19.9167	-43.9333
UFMG 12039*	<i>T. serrulatus</i>	MG	Belo Horizonte	-19.8683	-43.9658
Extração total	<i>T. serrulatus</i>	MG	Belo Horizonte	-19.9167	-43.9333
UFMG 5360	<i>T. serrulatus</i>	MG	Frutal	-20.0264	-48.9359
UFMG 12539*	<i>T. serrulatus</i>	MG	Morro do Pilar	-19.1630	-43.3645
UFMG 12543*	<i>T. serrulatus</i>	MG	Morro do Pilar	-19.1630	-43.3645
UFMG 12550*	<i>T. serrulatus</i>	MG	Morro do Pilar	-19.2248	-43.3833
UFMG 7207*	<i>T. serrulatus</i>	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1804
UFMG 11106	<i>T. serrulatus</i>	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1787
UFMG 11149	<i>T. serrulatus</i>	MG	Itacarambi	-15.0281	-44.4033
UFMG 12038*	<i>T. serrulatus</i>	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1787
MZSP 32443	<i>T. serrulatus</i>	MG	Ituiutaba	-18.9746	-49.4601
UFMG 4705	<i>T. serrulatus</i>	MG	Santa Bárbara	-19.9731	-43.4992
IBSP 6857	<i>T. serrulatus</i>	MG	Varginha	-21.5561	-45.4369
MZSP 15505	<i>T. serrulatus</i>	RJ	Valença	-22.2459	-43.7069
UFMG 13447	<i>T. serrulatus</i>	SC	Balneário Camboriú	-26.9911	-48.6353
UFMG 13444	<i>T. serrulatus</i>	SC	Biguaçu	-27.4947	-48.6609
UFMG 13445	<i>T. serrulatus</i>	SC	Biguaçu	-27.4947	-48.6609

UFMG 13446	<i>T. serrulatus</i>	SC	Joinville	-26.3050	-48.8461
IBSP 6845	<i>T. serrulatus</i>	SP	Americana	-22.7378	-47.3336
MZSP 29049	<i>T. serrulatus</i>	SP	Americana	-22.7378	-47.3336
IBSP 6861	<i>T. serrulatus</i>	SP	Espírito Santo do Pinhal	-22.1914	-46.7481
IBSP 6868	<i>T. serrulatus</i>	SP	Espírito Santo do Pinhal	-22.1914	-46.7481
UFMG 12035	<i>T. serrulatus</i>	SP	Olímpia	-20.7375	-48.9147
IBSP 5900*	<i>T. serrulatus</i>	SP	Piracicaba	-22.7343	-47.6481
IBSP 6839	<i>T. serrulatus</i>	SP	Piracicaba	-22.7343	-47.6481
IBSP 6853	<i>T. serrulatus</i>	SP	Sumaré	-22.8209	-47.2732
IBSP 6864	<i>T. serrulatus</i>	SP	Sumaré	-22.8209	-47.2732
IBSP 6867	<i>T. serrulatus</i>	SP	Sumaré	-22.8209	-47.2732
UFMG 12518	<i>T. aba</i>	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205
UFMG 17554	<i>T. kuryi</i>	BA	Palmeiras	-12.6594	-41.4856
UFMG 12530	<i>T. martinpaechi</i>	BA	Miguel Calmon	-11.4186	-40.5863
UFMG 15121	<i>T. melici</i>	MG	Grão Mogol	-16.5532	-42.9027
UFMG 12531	<i>T. stigmurus</i>	PI	São Raimundo Nonato	-8.8862	-42.5554

Anexo 2: Lista de espécies que atualmente compõe o complexo *Tityus stigmurus*, com principais características morfológicas e distribuição geográfica de cada espécie.

Características morfológicas	<i>T. aba</i>	<i>T. kuryi</i>	<i>T. martinpaechi</i>
Coloração geral	Amarelo claro ao amarelo escuro.	Marrom avermelhado escuro ao negro.	Amarelo claro ao amarelo escuro.
Número de dentes nos péctens	23-27 dentes	23-26 dentes	20-23 dentes
Número de fileiras de grânulos nos dedos dos pedipalpos	Dedo móvel: 16 Dedo fixo: 14	Dedo móvel: 17 Dedo fixo: 15	Dedo móvel: 16-17 Dedo fixo: 15-16
Coloração da carapaça	Predominantemente negra, exceto na região posterior aos olhos medianos.	Escurecida, com algumas manchas marrons claras.	Mancha escura em forma de triângulo invertido na porção anterior dos olhos medianos e manchas negras ao longo da carapaça.
Coloração do mesossoma	3 listras negras: <ul style="list-style-type: none"> • central: I-VII tergitos • laterais: I-VI tergitos 	Tergitos escurecidos, exceto o último, que é amarelado e tem apenas a porção central anterior negra.	3 listras negras: <ul style="list-style-type: none"> • central: I-VII tergitos • laterais: I-VI tergitos
Manchas nos pedipalpos e pernas	Ausentes	Presentes	Presentes
Grânulos espinóides do metassoma	3º: Um grânulo 4º: Um grânulo	3º: Dois ou três grânulos 4º: Três ou quatro grânulos Todos os grânulos bem desenvolvidos.	3º: Um grânulo 4º: Um grânulo
Comprimento Total	65-77 mm	55-78mm	65-74mm
Distribuição	Bahia	Bahia	Norte da Bahia ao Ceará.
Bibliografia	Candido, 2005 Souza, 2009 Almeida, 2010	Souza, 2009 Almeida, 2010 Santos, 2014	Lourenço, 2001 Souza, 2006 Souza, 2009 Almeida, 2010

Características morfológicas	<i>T. melici</i>	<i>T. serrulatus</i>	<i>T. stigmurus</i>
Coloração geral	Amarelo claro ao amarelo escuro.	Amarelo claro ao amarelo escuro.	Amarelo claro ao amarelo escuro.
Número de dentes nos péctens	22-27 dentes	21-25 dentes	22-24 dentes
Número de fileiras de grânulos nos dedos dos pedipalpos	Dedo móvel: 17 Dedo fixo: 15	Dedo móvel: 16-17 Dedo fixo: 15-16	Dedo móvel: 16-17 Dedo fixo: 15-16
Coloração da carapaça	Marrom acastanhada.	Mancha escura em forma de triângulo invertido na porção anterior dos olhos medianos e manchas negras ao longo da carapaça.	Mancha escura em forma de triângulo invertido na porção anterior dos olhos medianos.
Coloração do mesossoma	Marrom acastanhada, exceto último tergito, que é amarelado.	Manchas confluentes escuras, exceto no último tergito, que é amarelado e com a quilha central escurecida.	1 listra negra central, podendo haver listras laterais interrompidas.
Manchas nos pedipalpos e pernas	Ausentes	Ausentes	Ausentes
Grânulos espinóides no 3° e 4° segmento do metassoma	Grânulos espinóides ausentes ou muito reduzidos.	3°: Dois grânulos 4°: Três grânulos	3°: Dois grânulos 4°: Dois ou três grânulos
Comprimento Total	54-68mm	55-77mm	55-65mm
Distribuição	Centro de Minas Gerais ao centro-sul da Bahia.	Regiões Sul, Suldeste, Centro-oeste e Nordeste (exceto Maranhão) do Brasil; Tocantins.	Nordeste do Brasil (exceto Maranhão) e Fernando de Noronha.
Bibliografia	Lourenço, 2003 Souza, 2009 Almeida, 2010	Souza, 2009 Almeida, 2010	Souza, 2009 Almeida, 2010

Anexo 3: Lista dos espécimes utilizados nas análises moleculares, com respectivas localidades, coordenadas geográficas e genes seqüenciados.

Lote	UF	Localidade	Lat	Long	COI	16S	ITS
<i>Tityus aba</i>							
IBSP 6822	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205			X
IBSP 6823	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205			
IBSP 6824	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205		X	X
IBSP 6826	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205			X
IBSP 6827	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205	X		X
IBSP 6829	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205	X	X	X
IBSP 6830	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205	X	X	X
IBSP 6831	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205			X
IBSP 6832	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205			X
UFMG 12513	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205	X	X	X
UFMG 12514	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205			X
UFMG 12517	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205	X		X
UFMG 12518	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205	X	X	X
UFMG 12519	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205	X		
UFMG 12520	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205		X	
<i>Tityus kuryi</i>							
MZSP 36061	BA	Lençóis	-12.5667	-41.3833	X	X	X
UFMG 12528	BA	Palmeiras	-12.6594	-41.4856		X	
UFMG 17554	BA	Palmeiras	-12.6594	-41.4856	X		X
<i>Tityus melici</i>							
MZSP 36050	MG	Barroão	-7.5352	-34.9911	X	X	
UFMG 15120	MG	Grão Mogol	-16.5532	-42.9027	X		X
UFMG 15121	MG	Grão Mogol	-16.5532	-42.9027	X	X	X
UFMG 15122	MG	Grão Mogol	-16.5532	-42.9027	X	X	X
UFMG 15123	MG	Grão Mogol	-16.5532	-42.9027	X	X	X
UFMG	MG	Grão Mogol	-16.5532	-42.9027			X

15124							
UFMG 15125	MG	Grão Mogol	-16.5532	-42.9027	X	X	
UFMG 15126	MG	Grão Mogol	-16.5532	-42.9027	X	X	X
UFMG 15127	MG	Grão Mogol	-16.5532	-42.9027		X	X
MZSP 36047	MG	Montezuma	-15.1707	-42.4945		X	X
UFMG 11107	MG	Riacho dos Machados	-16.0758	-43.1242	X		X
UFMG 12482	MG	Riacho dos Machados	-16.0497	-43.1322			X
<i>Tityus martinpaechi</i>							
IBSP 6820	BA	Miguel Calmon	-11.4186	-40.5863		X	
IBSP 6821	BA	Miguel Calmon	-11.4186	-40.5863		X	
UFMG 12529	BA	Miguel Calmon	-11.4186	-40.5863	X	X	X
UFMG 12530	BA	Miguel Calmon	-11.4186	-40.5863	X	X	X
<i>Tityus serrulatus</i>							
MZUFBA 1795	BA						X
MZUFBA 2307	BA						X
MZUFBA 2322	BA						X
MZUFBA 2442	BA				X		X
MZUFBA 2443	BA				X		X
MZUFBA 2475	BA						X
MZSP 28198	BA	Condeúba	-14.9007	-42.0386		X	X
IBSP 6819	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205	X	X	X
IBSP 6825	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205	X	X	X
IBSP 6828	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205			X
UFMG 12524	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205	X		X
UFMG 12525	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205			X
UFMG 17552	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205	X	X	X
IBSP 17553	BA	Contendas do Sincorá	-13.9191	-41.1205	X	X	X
UFMG 12522	BA	Lençóis	-12.5453	-41.3981	X	X	X

UFMG 12526	BA	Lençóis	-12.5453	-41.3981	X		X
CHNUFPI 0127	BA	Macarás	-13.4380	-40.4336	X		X
UFMG 6537	DF	Brasília	-15.8267	-47.9218	X	X	X
UFMG 4070	MG	Belo Horizonte	-19.8678	-43.9672	X	X	X
UFMG 4071	MG	Belo Horizonte	-19.9167	-43.9333	X	X	X
UFMG 4072	MG	Belo Horizonte	-19.9167	-43.9333	X	X	X
UFMG 4073	MG	Belo Horizonte	-19.9167	-43.9333	X	X	X
UFMG 4074	MG	Belo Horizonte	-19.9167	-43.9333		X	X
UFMG 4703	MG	Belo Horizonte	-19.8683	-43.9658			X
UFMG 4706	MG	Belo Horizonte	-19.8217	-43.9556	X		X
UFMG 4707	MG	Belo Horizonte	-19.8217	-43.9556	X		X
UFMG 4826	MG	Belo Horizonte	-19.8461	-43.9942		X	X
UFMG 4827	MG	Belo Horizonte	-19.8461	-43.9942			X
UFMG 5354	MG	Belo Horizonte	-19.8461	-43.9942	X	X	X
UFMG 5355	MG	Belo Horizonte	-19.8461	-43.9942	X	X	X
UFMG 5366	MG	Belo Horizonte	-19.8461	-43.9942		X	X
UFMG 5367	MG	Belo Horizonte	-19.8461	-43.9942		X	X
UFMG 6539	MG	Belo Horizonte	-19.8184	-43.9556		X	X
UFMG 12034	MG	Belo Horizonte	-19.8683	-43.9658			X
UFMG 12039	MG	Belo Horizonte	-19.8683	-43.9658		X	X
UFMG 12523	MG	Espinosa	-14.9466	-42.8349	X	X	
UFMG 5360	MG	Frutal	-20.0264	-48.9359	X		X
UFMG 4479	MG	Itacarambi	-15.1869	-44.2044	X		X
UFMG 4510	MG	Itacarambi	-15.1869	-44.2044	X		X
UFMG 4513	MG	Itacarambi	-15.1869	-44.2044	X		X
UFMG 4515	MG	Itacarambi	-15.1869	-44.2044			X
UFMG 4518	MG	Itacarambi	-15.1525	-44.2417			X

UFMG 4821	MG	Itacarambi	-15.1869	-44.2044			X
UFMG 4825	MG	Itacarambi	-15.1869	-44.2044			X
UFMG 5357	MG	Itacarambi	-15.1525	-44.2417		X	X
UFMG 5358	MG	Itacarambi	-15.1525	-44.2417		X	X
UFMG 5359	MG	Itacarambi	-15.1525	-44.2417	X	X	
UFMG 7207	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1804	X	X	X
UFMG 7362	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1804		X	X
UFMG 7477	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1787	X		
UFMG 7602	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1787	X		
UFMG 11104	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1804			X
UFMG 11105	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1804		X	X
UFMG 11106	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1787	X	X	
UFMG 11146	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1804			X
UFMG 11147	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1804			X
UFMG 11148	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1804			X
UFMG 11149	MG	Itacarambi	-15.0281	-44.4033	X	X	X
UFMG 11153	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1804			X
UFMG 11154	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1804			X
UFMG 11156	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1804			X
UFMG 11158	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1804			X
UFMG 11159	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1804			X
UFMG 11162	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1804	X	X	X
UFMG 11163	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1804	X	X	X
UFMG 11367	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1804			X
UFMG 11368	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1787	X		
UFMG 12038	MG	Itacarambi	-15.1730	-44.1787	X	X	
UFMG 12471	MG	Itacarambi	-15.1719	-44.1803	X	X	

UFMG 11099	MG	Itaobim	-16.5688	-41.4808	X	X	X
UFMG 11102	MG	Itaobim	-16.5955	-41.5793	X	X	X
UFMG 11103	MG	Itaobim	-16.5955	-41.5793		X	X
UFMG 12479	MG	Itaobim	-16.5688	-41.4808		X	X
MZSP 32443	MG	Ituiutaba	-18.9746	-49.4601	X	X	X
UFMG 11366	MG	Jaboticatubas	-19.5105	-43.9187		X	
UFMG 6400	MG	Lagoa Santa	-19.6256	-43.9072	X	X	X
UFMG 6401	MG	Lagoa Santa	-19.6256	-43.9072		X	X
UFMG 11952	MG	Morro do Pilar	-19.2156	-43.3761			X
UFMG 11953	MG	Morro do Pilar	-19.2156	-43.3761	X	X	X
UFMG 12538	MG	Morro do Pilar	-19.1630	-43.3645	X	X	X
UFMG 12539	MG	Morro do Pilar	-19.1630	-43.3645	X	X	X
UFMG 12541	MG	Morro do Pilar	-19.1630	-43.3645			X
UFMG 12542	MG	Morro do Pilar	-19.1760	-43.3746	X		X
UFMG 12543	MG	Morro do Pilar	-19.1630	-43.3645	X	X	X
UFMG 12545	MG	Morro do Pilar	-19.1630	-43.3645		X	X
UFMG 12547	MG	Morro do Pilar	-19.1760	-43.3746			X
UFMG 12549	MG	Morro do Pilar	-19.1630	-43.3645	X		
UFMG 12550	MG	Morro do Pilar	-19.2248	-43.3833	X		X
UFMG 12551	MG	Morro do Pilar	-19.2248	-43.3833	X		X
UFMG 12552	MG	Morro do Pilar	-19.2248	-43.3833	X	X	X
UFMG 12555	MG	Morro do Pilar	-19.1630	-43.3645	X		
UFMG 12557	MG	Morro do Pilar	-19.1630	-43.3645		X	
UFMG 6534	MG	Nova Lima	-19.9876	-43.8463		X	
UFMG 6535	MG	Sabará	-19.8893	-43.8050		X	X
UFMG 4705	MG	Santa Bárbara	-19.9731	-43.4992	X	X	X
IBSP 6857	MG	Varginha	-21.5561	-45.4369	X	X	X

IBSP 6858	MG	Varginha	-21.5561	-45.4369	X	X	X
IBSP 6859	MG	Varginha	-21.5561	-45.4369	X	X	X
IBSP 6860	MG	Varginha	-21.5561	-45.4369	X	X	X
IBSP 6817	PE	Triunfo	-7.8456	-38.0419	X	X	X
UFMG 17551	PE	Triunfo	-7.8456	-38.0419	X	X	X
MZSP 15505	RJ	Valença	-22.2459	-43.7069	X	X	X
UFMG 13447	SC	Balneário Camboriú	-26.9911	-48.6353	X	X	X
UFMG 13448	SC	Balneário Camboriú	-26.9911	-48.6353		X	X
UFMG 13444	SC	Biguaçu	-27.4947	-48.6609		X	X
UFMG 13445	SC	Biguaçu	-27.4947	-48.6609	X	X	
UFMG 13446	SC	Joinville	-26.3050	-48.8461	X	X	X
IBSP 6845	SP	Americana	-22.7378	-47.3336	X	X	X
IBSP 6846	SP	Americana	-22.7378	-47.3336	X	X	X
IBSP 6847	SP	Americana	-22.7378	-47.3336	X	X	X
IBSP 6848	SP	Americana	-22.7378	-47.3336	X		X
IBSP 6849	SP	Americana	-22.7378	-47.3336		X	X
IBSP 6850	SP	Americana	-22.7378	-47.3336	X	X	X
MZSP 29049	SP	Americana	-22.7378	-47.3336	X	X	X
IBSP 6842	SP	Araraguara	-21.8023	-48.1730	X	X	X
IBSP 6843	SP	Araraguara	-21.8023	-48.1730	X	X	X
IBSP 6844	SP	Araraguara	-21.8023	-48.1730	X	X	X
IBSP 6861	SP	Espírito Santo do Pinhal	-22.1914	-46.7481	X	X	X
IBSP 6862	SP	Espírito Santo do Pinhal	-22.1914	-46.7481	X	X	X
IBSP 6863	SP	Espírito Santo do Pinhal	-22.1914	-46.7481	X	X	X
IBSP 6868	SP	Espírito Santo do Pinhal	-22.1914	-46.7481	X	X	X
IBSP 6869	SP	Espírito Santo do Pinhal	-22.1914	-46.7481	X		
IBSP 6870	SP	Espírito Santo do Pinhal	-22.1914	-46.7481	X	X	

IBSP 6871	SP	Espírito Santo do Pinhal	-22.1914	-46.7481	X	X	X
IBSP 6872	SP	Espírito Santo do Pinhal	-22.1914	-46.7481		X	X
IBSP 6836	SP	Jundiaí	-23.1857	-46.8978	X	X	X
IBSP 6837	SP	Jundiaí	-23.1857	-46.8978	X	X	X
IBSP 6838	SP	Jundiaí	-23.1857	-46.8978	X	X	X
UFMG 12035	SP	Olímpia	-20.7375	48.9147	X	X	X
IBSP 5900	SP	Piracicaba	-22.7343	-47.6481	X	X	X
IBSP 6839	SP	Piracicaba	-22.7343	-47.6481	X	X	X
IBSP 6840	SP	Piracicaba	-22.7343	-47.6481		X	X
IBSP 6851	SP	Piracicaba	-22.7343	-47.6481		X	X
IBSP 6852	SP	Piracicaba	-22.7343	-47.6481	X	X	X
UFMG 6873	SP	Piracicaba	-22.7343	-47.6481	X		
IBSP 5901	SP	Sumaré	-22.8209	-47.2732	X	X	X
IBSP 6853	SP	Sumaré	-22.8209	-47.2732	X	X	X
IBSP 6854	SP	Sumaré	-22.8209	-47.2732	X		X
IBSP 6855	SP	Sumaré	-22.8209	-47.2732	X	X	
IBSP 6864	SP	Sumaré	-22.8209	-47.2732	X	X	X
IBSP 6865	SP	Sumaré	-22.8209	-47.2732		X	
IBSP 6866	SP	Sumaré	-22.8209	-47.2732		X	
IBSP 6867	SP	Sumaré	-22.8209	-47.2732	X	X	X
IBSP 6874	SP	Sumaré	-22.8209	-47.2732	X	X	X
<i>Tityus stigmurus</i>							
MZUFBA 2065	BA						X
MZUFBA 2282	BA						X
MZUFBA 2397	BA					X	X
UFMG 12032	BA	Paripiranga	-10.6863	-37.8629	X	X	X
UFMG 12041	BA	Paripiranga	-10.6863	-37.8629	X	X	X

IBSP 6833	CE	Crato	-7.2324	-39.438	X	X	X
IBSP 6834	CE	Crato	-7.2324	-39.438	X	X	X
IBSP 6835	CE	Crato	-7.2324	-39.438			X
UFMG 12533	CE	Crato	-7.2324	-39.438	X	X	X
UFMG 12534	CE	Crato	-7.2324	-39.438	X	X	X
UFMG 12546	CE	Fortaleza	-3.7184	-38.5434			X
UFMG 12554	CE	Fortaleza	-3.7184	-38.5434			X
MZSP 36079	PB	Maturéia	-7.2742	-37.3613	X	X	
MZSP 36081	PE	Buíque	-8.5764	-37.2461	X	X	X
UFMG 6553	PE	Recife	-8.0543	-34.8813		X	X
MZSP 36080	PE	Triunfo	-7.8428	-38.1136		X	X
UFMG 12531	PI	São Raimundo Nonato	-8.8862	-42.5554	X	X	X
UFMG 12532	PI	São Raimundo Nonato	-8.8862	-42.5554	X	X	X
UFMG 17299	RN	Natal	-5.7793	-35.2009	X	X	X
UFMG 17300	RN	Natal	-5.7793	-35.2009	X	X	X
UFMG 17301	RN	Natal	-5.7793	-35.2009		X	X

Grupo Externo

<i>Opisthacanthus sp.</i>							
UFMG	TO	Xambioá	-6.4111	-48.5361	X		
3735							
<i>Rhopalurus sp.</i>							
UFMG	MG	Itacarambi	-15.1525	-44.2417	X		
4818							
<i>Tityus bahiensis</i>							
UFMG	MG	Ouro Preto	-20.4348	-43.5091	X	X	
3731							
<i>Tityus costatus</i>							
UFMG	ES	Mimoso do Sul	-21.0658	-41.3678	X	X	X
3732							
UFMG	ES	Presidente Kennedy	-20.0167	-40.0833	X	X	X
3737							
UFMG	ES	Presidente Kennedy	-20.0167	-40.0833	X	X	X
3738							
<i>Tityus thelyacanthus</i>							
UFMG	GO	Catalão	-18.1139	-47.6211	X	X	X
3946							
<i>Tityus sp. 1</i>							
UFMG	TO	Ananás	-6.3653	-48.0725	X		
3734							
<i>Tityus sp. 2</i>							
UFMG	GO	Catalão	-18.1139	-47.6211			X
3943							
UFMG	GO	Catalão	-18.1139	-47.6211	X		
3944							
UFMG	GO	Catalão	-18.1139	-47.6211		X	X
3945							

Anexo 4: Número de indivíduos de cada espécie do complexo *Tityus stigmurus* e grupo externo seqüenciados para os genes COI, 16S e ITS.

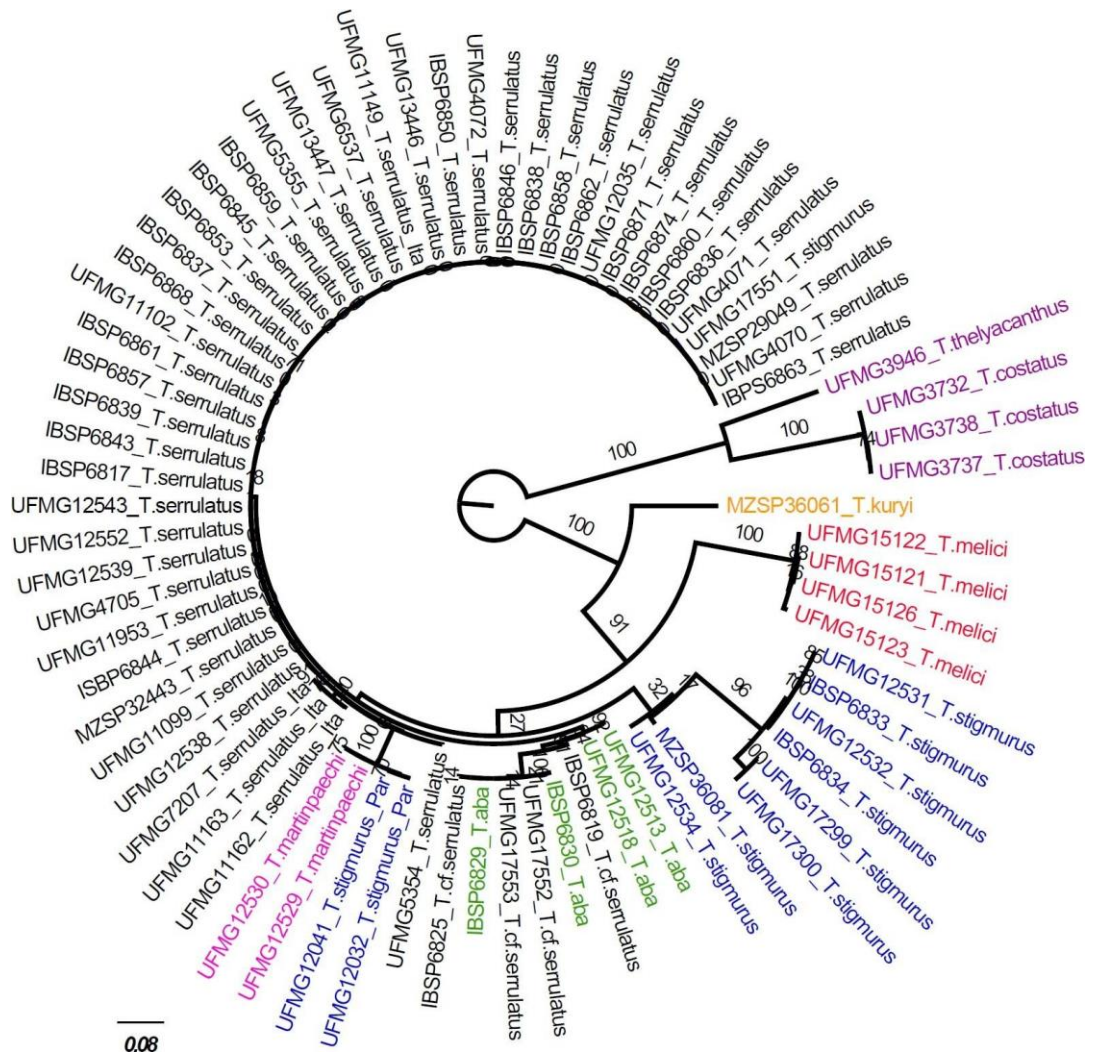
Gene	COI	16S	ITS
<i>T. aba</i>	7	6	12
<i>T. kuryi</i>	2	2	2
<i>T. melici</i>	8	8	10
<i>T. martinpaechi</i>	2	4	2
<i>T. serrulatus</i>	90	92	125
<i>T. stigmurus</i>	14	18	20
<i>Tityus sp.</i>	7	6	6
<i>Rhopalurus</i>	1	-	-
<i>Opisthacanthus</i>	1	-	-
<i>Total</i>	132	136	177

Anexo 5: Comprimento total dos genes COI, 16S e ITS em pares de bases, número de sítios variáveis e invariáveis e suas respectivas porcentagens e quantidade de inserções e deleções em cada marcador. Primeiro, os valores são dados comparando-se somente espécimes do complexo *T. stigmurus* e, em seqüência, comparando-se os exemplares desse complexo e o grupo externo.

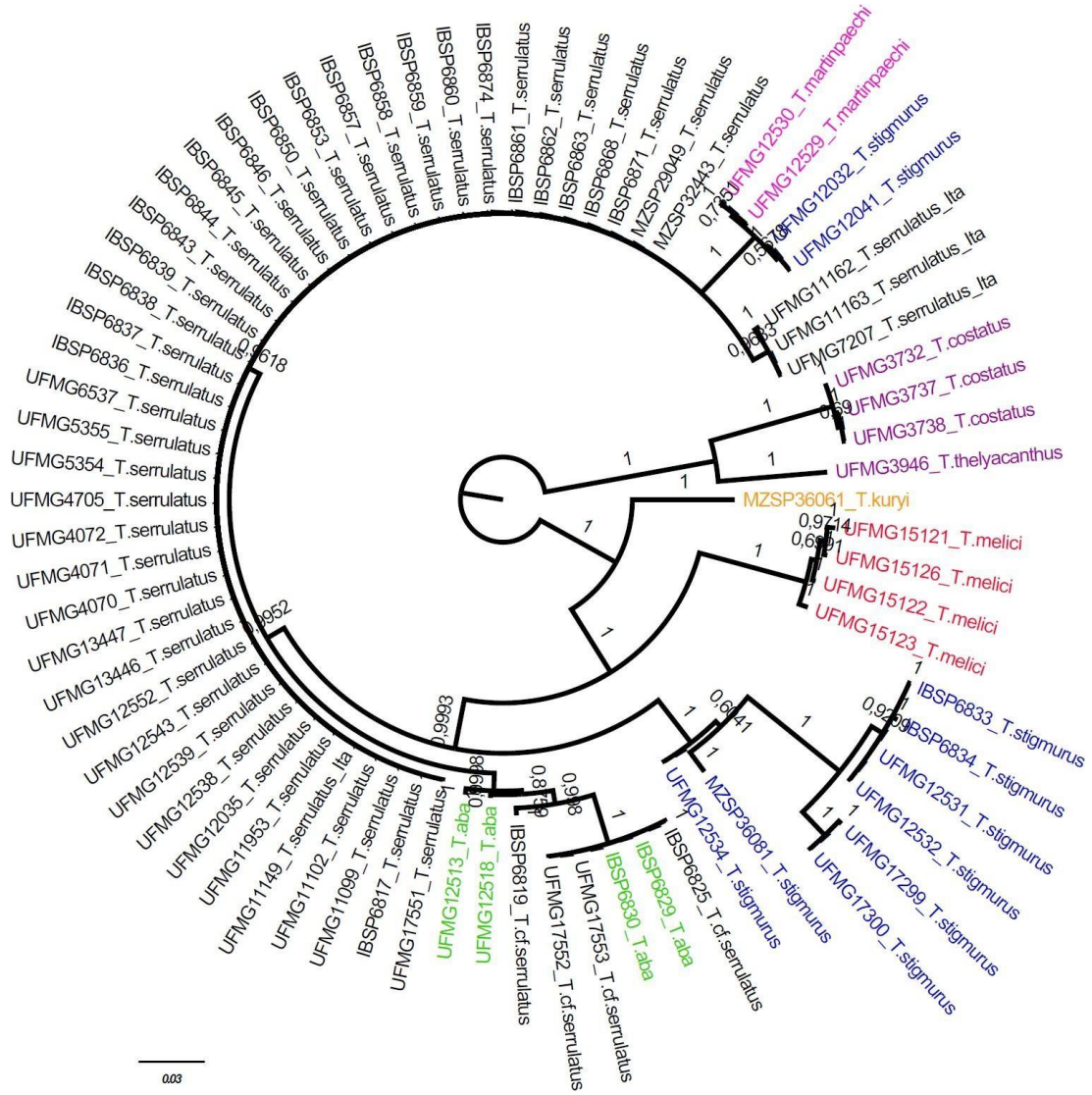
Conjunto de dados	Total de pb	Sítios variáveis	% de sítios variáveis	Sítios não variáveis	% de sítios não variáveis	Inserções/ Deleções
Complexo <i>T. stigmurus</i>						
COI	486	110	22,63%	376	77,37%	-
16S	323	69	21,36%	254	78,64%	1 sítio
ITS	281	7	2,49%	274	97,51%	-
COI + 16S	809	167	20,64%	642	79,36%	1 sítio
COI + 16S + ITS	1090	171	15,69%	919	84,31%	1 sítio
Complexo <i>T. stigmurus</i> e grupo externo						
COI	486	199	40,95%	287	59,05%	-
16S	324	99	30,56%	225	69,45%	2 sítios
ITS	288	56	19,45%	232	80,56%	18 sítios
COI + 16S	810	231	28,52%	579	71,48%	2 sítios
COI + 16S + ITS	1098	284	25,87%	814	74,13%	20 sítios

Anexo 9: Árvore de Máxima Verossimilhança (A) e Inferência Bayesiana (B) para os genes mitocondriais COI e 16S concatenados. Números nos ramos representam valores de *bootstrap* e probabilidade posterior, respectivamente.

A

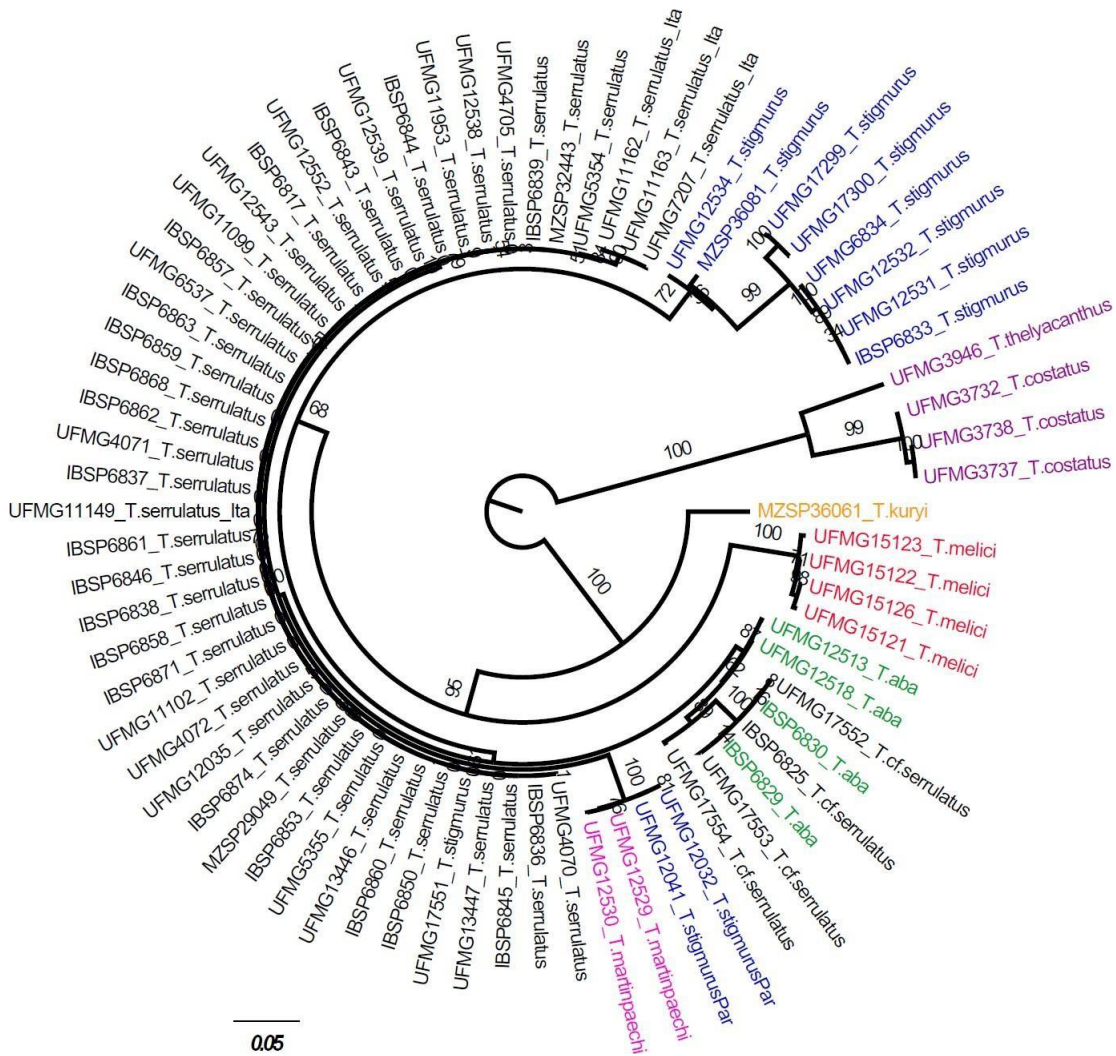


B

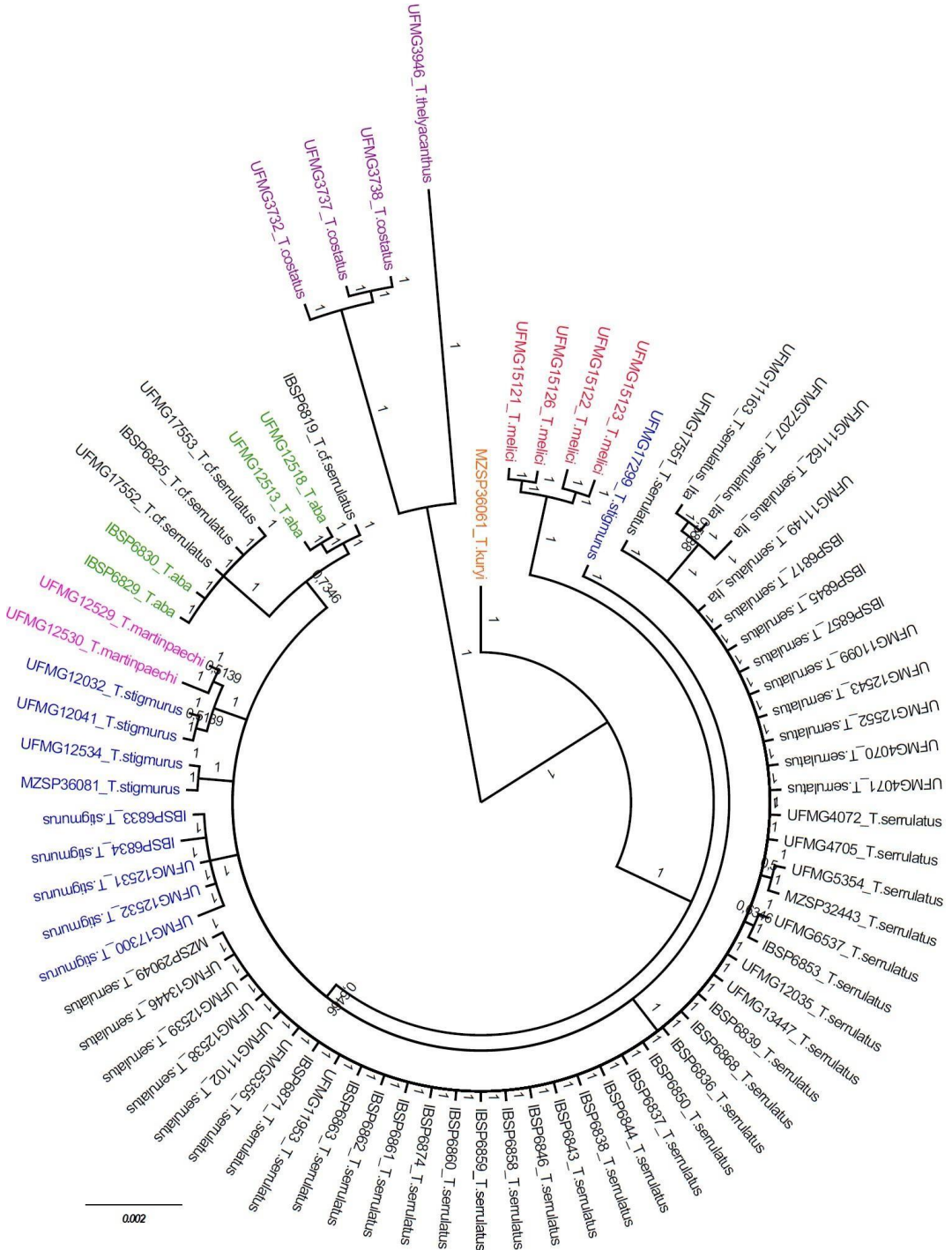


Anexo 10: Árvore de Máxima Verossimilhança (A) e Inferência Bayesiana (B) para os genes mitocondriais COI e 16S e o gene nuclear ITS concatenados. Números nos ramos representam valores de *bootstrap* e probabilidade posterior, respectivamente.

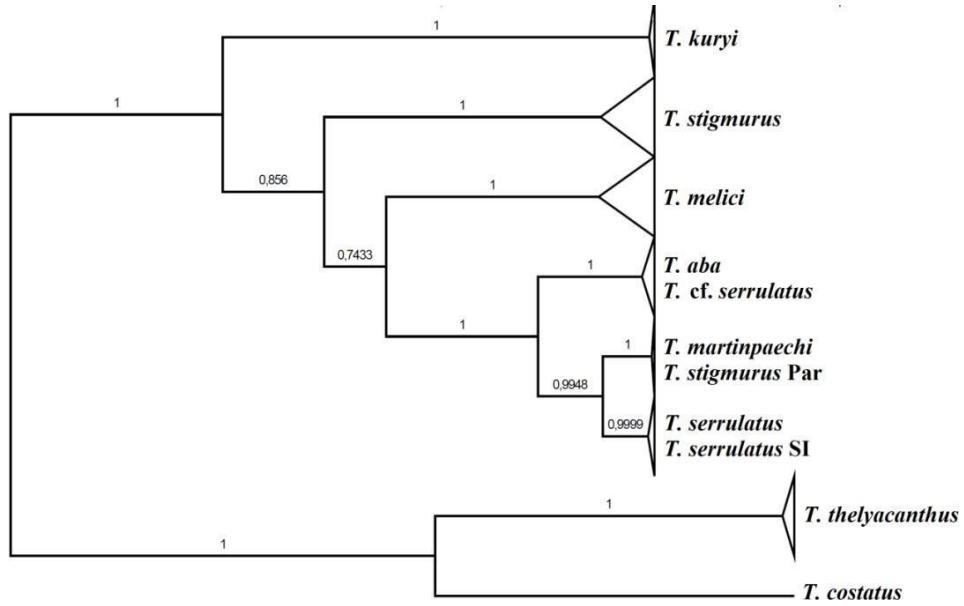
A



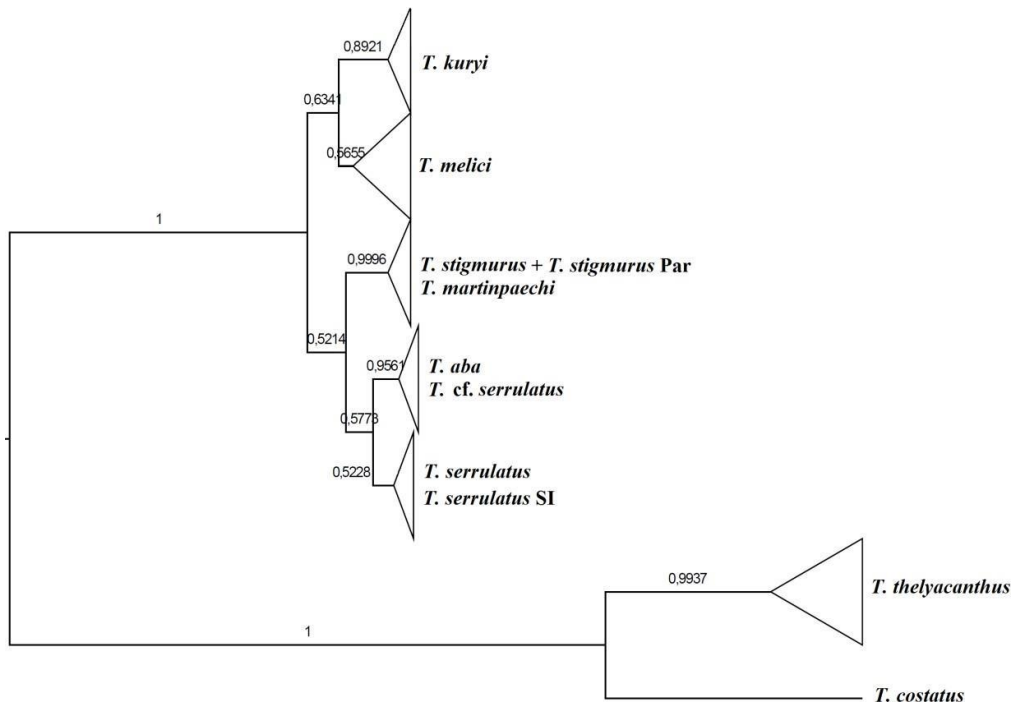
B



Anexo 12: Árvore do gene mitocondrial 16S contido na árvore de espécies. Valores nos nós representam a probabilidade posterior do clado.



Anexo 13: Árvore do gene nuclear ITS2 contido na árvore de espécies. Valores nos nós representam a probabilidade posterior do clado.



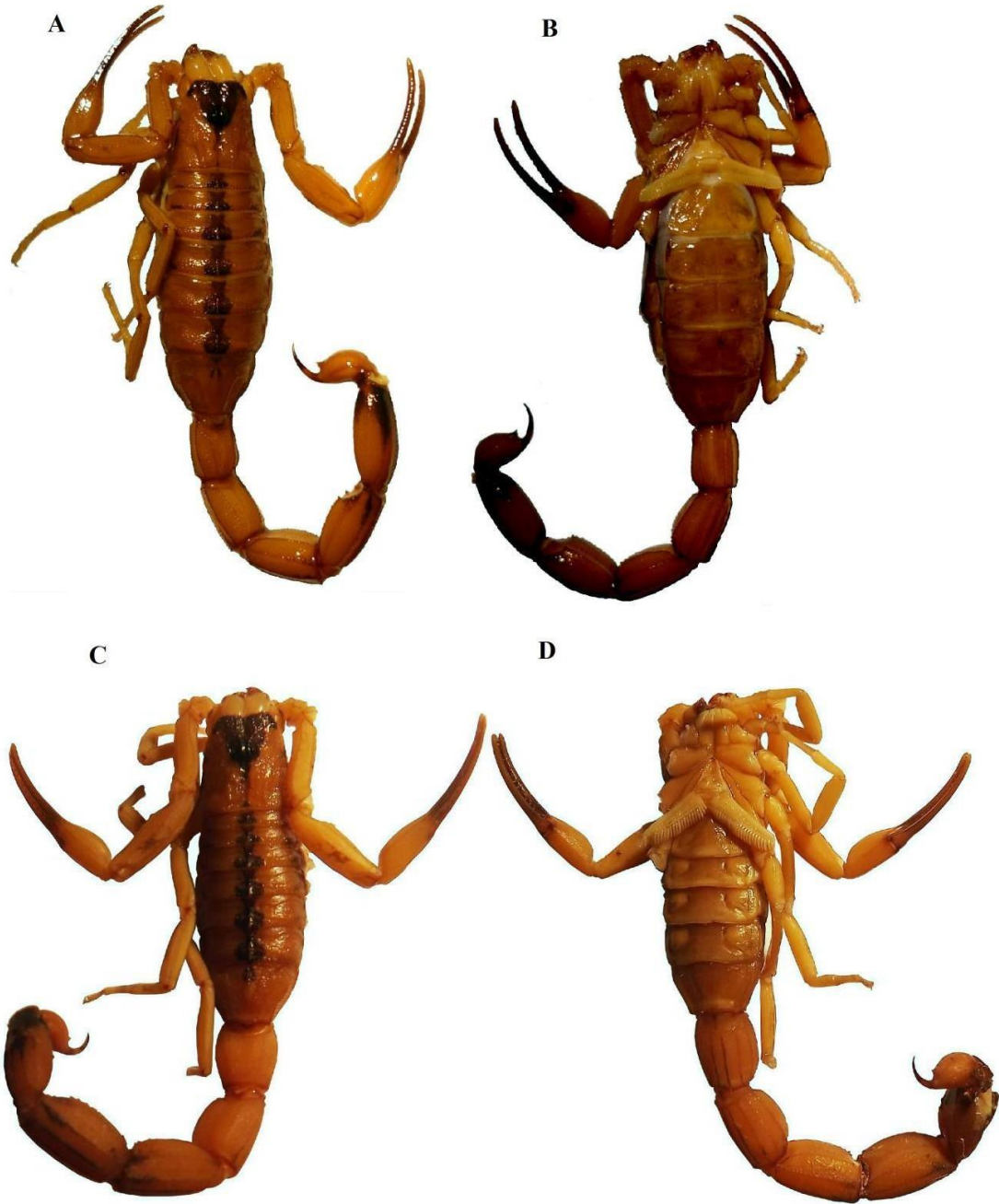
Anexo 14: *Tityus kuryi*. Fêmea UFMG17555 em visão dorsal (A) e em visão ventral (B). Macho UFMG17554 em visão dorsal (C) e em visão ventral (D).



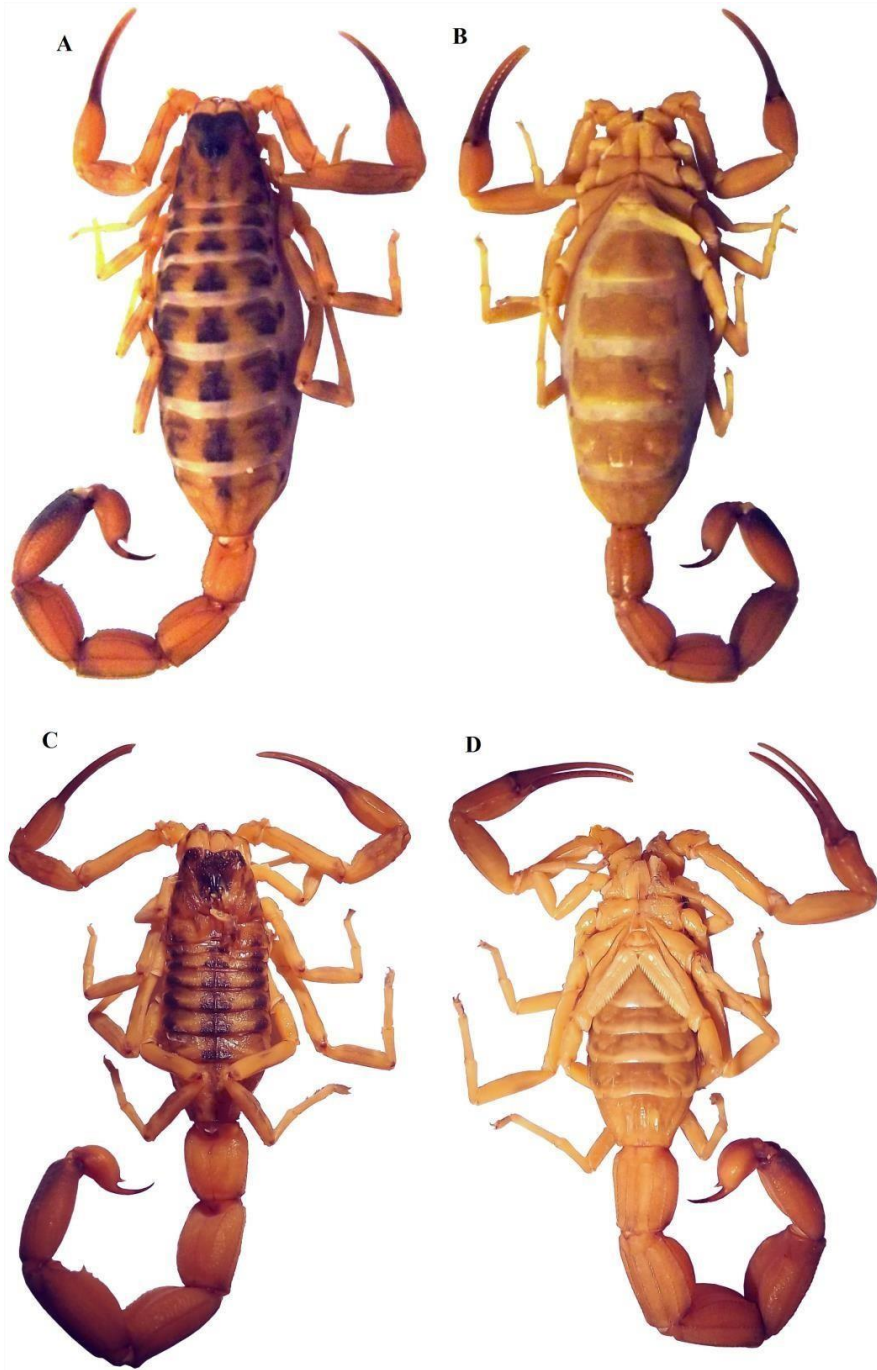
Anexo 15: Macho (acima) de *T. aba* sem manchas nas pernas e pedipalpos. Fêmea (abaixo) da mesma espécie com manchas nas pernas e pedipalpos.



Anexo 16: *Tityus stigmurus*: Fêmea UFMG12032 em visão dorsal (A) e em visão ventral (B). Macho UFMG12033 em visão dorsal (C) e em visão ventral (D).



Anexo 17: *Tityus martinpaechi*: Fêmea UFMG17558 em visão dorsal (A) e em visão ventral (B). Macho UFMG17557 em visão dorsal (C) e em visão ventral (D).



Anexo 18: *Tityus cf. serrulatus*: Fêmea UFMG17556 em visão dorsal (A) e em visão ventral (B). Macho IBSP6818 em visão dorsal (C) e em visão ventral (D).



Anexo 19: *Tityus aba*: Fêmea IBSP6842 em visão dorsal (A) e em visão ventral (B). Macho MZSP28196 em visão dorsal (C) e em visão ventral (D).



Anexo 20: *Tityus melici*: Fêmea UFMG15121 em visão dorsal (A) e em visão ventral (B). Macho UFMG15120 em visão dorsal (C) e em visão ventral (D).



Anexo 21: *Tityus serrulatus* Ita: Fêmea UFMG11156 em visão dorsal (A) e em visão ventral (B). Macho UFMG7476 em visão dorsal (C) e em visão ventral (D). *T. serrulatus* partenogenético: Fêmea UFMG12039 em visão dorsal (E) e em visão ventral (F).

