

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**  
**PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E**  
**BIOLOGIA MOLECULAR**



**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Anastrepha***  
***fraterculus* (WIEDEMANN) (DIPTERA:TEPHRITIDAE) COM ÊNFASE NO**  
**ESTADO DA BAHIA**

**LÍDIA NOGUEIRA SILVA**

**ILHÉUS-BAHIA-BRASIL**

**Abril de 2008**

**LÍDIA NOGUEIRA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Anastrepha fraterculus* (WIEDEMANN) (DIPTERA:TEPHRITIDAE) ) COM ÊNFASE NO ESTADO DA BAHIA**

**Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.**

**ILHÉUS-BAHIA-BRASIL**

**Abril de 2008**

**LÍDIA NOGUEIRA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Anastrepha fraterculus* (WIEDEMANN) (DIPTERA:TEPHRITIDAE) COM ÊNFASE NO ESTADO DA BAHIA**

**Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.**

Prof. Dr. Elton Lúcio de Araújo

Profa. Dr<sup>a</sup> Romari Martinez Montaña

Prof. Dr. Paulo dos Santos Terra

Profa. Dr<sup>a</sup> Janisete Gomes da Silva Miller

## DEDICATÓRIA

*Não apenas esta dissertação, mas todas minhas conquistas profissionais são dedicadas a Deus, aos meus pais e irmãos que nenhum momento deixaram de me apoiar e ao Fábio companheiro de hoje e de sempre.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz e seus docentes pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, pela concessão da bolsa e pelo financiamento do projeto. À UESC pelo apoio nas viagens de coleta.

A Profa. Dra. Janisete Gomes da Silva Miller pela orientação e ensinamentos.

Ao Prof. Marco Antônio Costa pelo apoio, incentivo e paciência nas horas mais difíceis.

À Vanderly pela presença constante, ensinamentos, incentivo e disponibilidade. Este espaço é muito pequeno para agradecer o que você fez por mim.

À Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia, principalmente à Consuelo Nunes e Raimundo Sampaio pelo fornecimento de algumas amostras incluídas neste trabalho.

Ao Robson Dias pela incrível ajuda com o sequenciamento, pelos momentos de descontração e de bronca também.

Ao Dr. Bruce McPherson e Raul Ruiz-Arce do Dept of Entomology, Penn State University, pelo apoio e pela concessão das amostras incluídas neste trabalho.

Ao Zilton pela disponibilidade e pelo fornecimento de algumas amostras incluídas neste trabalho.

Ao Carlos Eduardo pelas valiosas dicas e disponibilidade em sempre ajudar.

Aos companheiros das coletas inesquecíveis Olívia, Cíntia, Cíntia Bezerra, Vinina, Mirian, Vivian e Nívea. Foram momentos cansativos mais muito felizes!!

Aos colegas do Laboratório de Entomologia, Mirian, Vivian e Olívia pela ajuda na identificação das moscas e pelo fornecimento de algumas amostras incluídas neste trabalho.

Aos colegas Cristiano e Braz pela ajuda nas análises das seqüências.

Às colegas Bruna, Olívia Duarte, Cíntia, Polliana, Priscila, Fabiana pelo fornecimento de frutos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Citogenética e Marcadores, Priscila Abreu, Grazi, Vilminha, Paloma, Claudine, Samuel, Dani, Kátia, Will, Carol, Tony, Rodolfo, Van, Olívia, Cíntia, Cíntia Bezerra, Lana e Vanessa pelos conselhos, ajuda e momentos de alegria.

Ao Prof. Juvenal Cordeiro pela amizade e por despertar-me a importância da pesquisa.

À minhas irmãs emprestadas Polliana e Priscila pelo carinho e amizade eternas.

Aos meus pais, Olinda e Rogens, pessoas que sempre foram exemplos de coragem, amor, determinação, retidão e perseverança. Aos meus irmãos Roberta e Marcos pelo apoio e pelos momentos de alegria.

A vizinha por seu exemplo de vida e a minha família, pelo carinho e apoio.

Ao Fábio pelo amor e incentivo por ser a motivação do meu progresso.

À Daniela e sua família pelo apoio e amizade sempre demonstrada.

Às amigas Ruth, Adriana, Kátia e Mirian pelos momentos de alegria.

À Deus por ter colocado todas essas pessoas no meu caminho nos momentos certos.

## EPÍGRAFE

*Na falta de algo melhor  
nunca me faltou coragem  
Se eu soubesse antes o que sei agora  
erraria tudo exatamente igual...*

*(Surfando Karmas e DNA, Humberto Gessinger)*

## ÍNDICE

EXTRATO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Espécies crípticas.....	4
2.2. Moscas-das-frutas.....	7
2.3. <i>Anastrepha fraterculus</i> , um complexo de espécies crípticas.....	11
2.4. Características do DNA mitocondrial animal.....	15
2.5. DNA mitocondrial como marcador genético.....	17
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo geral.....	21
3.2. Objetivos específicos.....	21
4. METODOLOGIA.....	22
4.1. Obtenção e identificação dos exemplares estudados.....	22
4.2. Extração de DNA total.....	23
4.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	27
4.4. PCR-RFLP - gene ND6.....	28
4.5. Reação de purificação.....	28



4.6. Sequenciamento.....	31
4.6.1. Reação de Sequenciamento.....	31
4.6.2. Obtenção das seqüências.....	31
4.7. Análise das seqüências.....	31
4.8. Análise filogenética.....	32
5. RESULTADOS.....	34
5.1. Distribuição e relação com o hospedeiro dos espécimes coletados.....	34
5.2. Extração e Amplificação do gene ND6.....	38
5.3. PCR-RFLP - gene ND6.....	39
5.4. Sequenciamento do gene mitocondrial ND6.....	42
5.4.1 Método de Agrupamento de Vizinhos (Neighbor-Joining).....	43
6. DISCUSSÃO.....	46
6.1. Distribuição e relação com o hospedeiro dos espécimes coletados.....	46
6.2. PCR-RFLP gene ND6.....	49
6.3. Sequenciamento do gene mitocondrial ND6.....	51
7. CONCLUSÃO.....	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
9. APÊNDICES.....	72
Apêndice A: Alinhamento das amostras seqüenciadas neste trabalho (gene ND6).....	73
Apêndice B: Distâncias calculadas pelo método de Jukes-Cantor para todas as amostras seqüenciadas gene ND6.....	77

Apêndice C: Tamanhos dos fragmentos em heteroplasmia encontrados em indivíduos de *A. fraterculus* em diferentes localidades do estado da Bahia e Laranjal Paulista (SP).....

79

## ÍNDICE DE FIGURAS

1	Mapa mostrando os locais de coleta de moscas-das-frutas em três estados do Brasil.....	26
2	Mapa circular do DNA mitocondrial de <i>Drosophila yakuba</i> mostrando a localização e a direção da transcrição dos genes.....	30
3	Amplificação do DNA gene ND6.....	38
4	Padrão de restrição para o gene ND6 submetido à digestão pela enzima <i>Sspl</i> .....	39
5	Padrões de restrição para o gene ND6 submetido à digestão pela enzima <i>DraI</i> , exemplares de <i>Anastrepha fraterculus</i> da população que apresentou variação intrapopulacional.....	40
6	Padrões de restrição para o gene ND6 submetido à digestão pela enzima <i>DraI</i> , exemplares de <i>Anastrepha fraterculus</i> do Estado da Bahia.....	41
7	Relações filogenéticas entre populações de <i>Anastrepha fraterculus</i> inferidas de uma árvore construída pelo método de Neighbor-Joining baseada nas distâncias de Jukes-Cantor.....	45

## ÍNDICE DE TABELAS

1	Descrição das localidades e dos hospedeiros coletados.....	24
2	Seqüências dos <i>primers</i> utilizados para amplificar o gene ND6.....	27
3	Programa utilizado na amplificação do gene ND6.....	27
4	Indivíduos analisados nas técnicas de PCR/RFLP e sequenciamento do gene ND6.....	29
5	Lista de espécies e populações do grupo <i>fraterculus</i> seqüenciadas por Smith-Caldas (2001), gene ND6.....	32
6	Caracterização da distribuição geográfica, dos hospedeiros e das espécies de moscas-das-frutas coletadas nos Estados da Bahia, Espírito Santo e São Paulo.....	36
7	Haplótipos encontrados nas amostras de <i>Anastrepha fraterculus</i> .....	41

## EXTRATO

SILVA, Lúcia Nogueira, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, abril de 2008. **Caracterização Genética de Populações de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera:Tephritidae) com ênfase no Estado da Bahia.** Orientadora: Dr<sup>a</sup> Janisete Gomes da Silva Miller. Co-orientador: Dr. Marco Antônio Costa.

*Anastrepha fraterculus* é uma das espécies de moscas-das-frutas de maior importância econômica na região Neotropical. Evidências morfológicas, genéticas e biológicas indicam que a espécie nominal é na realidade um complexo de espécies crípticas (BUSH, 1962; MORGANTE et al., 1980; STECK, 1991; BARR, 2005; SELIVON et al., 2005). O presente trabalho teve como objetivo avaliar a possível ocorrência de um complexo de espécies crípticas entre populações da espécie nominal *A. fraterculus* no estado da Bahia através das técnicas moleculares de PCR-RFLP e do sequenciamento do gene mitocondrial da subunidade 6 da NADH desidrogenase (ND6). Na análise de PCR-RFLP do gene ND6 foram examinadas 27 populações de diferentes localidades da Bahia, uma população do Espírito Santo e uma população de São Paulo. Não foi detectado polimorfismo nas populações da Bahia e do Espírito Santo, contudo foi detectada variação intrapopulacional em Laranjal Paulista, SP utilizando-se a enzima *DraI*. Além disso, foi observada a presença de provável heteroplasmia em alguns indivíduos do estado da Bahia. O sequenciamento do gene ND6 evidenciou a presença de 17 haplótipos entre 33 indivíduos das 16 populações de *A. fraterculus* examinadas. As relações filogenéticas entre os táxons foram inferidas pelo método de “Neighbor-Joining” utilizando-se a distância de Jukes-Cantor e indicaram que as populações de *A. fraterculus* não formam um grupo monofilético. As populações desta espécie formaram agrupamentos com outras espécies do grupo *fraterculus* como *A. amita*, *A. sororcula* e *A. obliqua*. Verificou-se baixa distância genética entre indivíduos de populações geograficamente distantes e distância genética alta

entre indivíduos da mesma localidade coletados na mesma espécie de hospedeiro. Os resultados obtidos no presente trabalho fornecem informações importantes para diversos estudos posteriores tendo em vista a complexidade taxonômica da espécie *A. fraterculus*.

Palavras-chaves: Insecta, espécies crípticas, ND6, PCR/RFLP.

## ABSTRACT

SILVA, Lídia Nogueira, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, abril de 2008. **Genetic characterization of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) populations (Diptera:Tephritidae) with emphasis in the state of Bahia.** Advisor: Dr<sup>a</sup> Janisete Gomes da Silva Miller. Co-advisor: Dr. Marco Antônio Costa.

*Anastrepha fraterculus* is one of the most economically important species of fruit flies in the Neotropical region. Morphological, genetic and biological evidences indicate that the nominal species is actually a cryptic species complex (BUSH, 1962; MORGANTE et al., 1980; STECK, 1991; BARR, 2005; SELIVON et al., 2005). This study aimed at evaluating the possible occurrence of a complex of cryptic species in populations of the nominal species *A. fraterculus* in the state of Bahia using PCR-RFLP and sequencing of the mitochondrial ND6 gene. In the PCR-RFLP analyses, a total of 27 populations from the state of Bahia, one population from the state of Espírito Santo and one population from the state of São Paulo were examined. No polymorphism was detected in the populations from Bahia and Espírito Santo, however, intrapopulational variation was detected in Laranjal Paulista, SP using the restriction enzyme *Dra*I. Furthermore, the possible occurrence of heteroplasmy was observed in some individuals. Sequencing of the ND6 gene evidenced the presence of 17 haplotypes among the 33 individuals from the 16 populations examined. Phylogenetic relationships were inferred using the neighbor-joining (NJ) method with Jukes-Cantor distance and revealed that the *A. fraterculus* populations do not form a monophyletic group. Populations of this species clustered with other species within the *fraterculus* group such as *A. amita*, *A. sororcula* and *A. obliqua*. Low genetic distances were observed among individuals from geographically distant populations and high genetic distances among individuals from the same localitie and host. The results obtained in this study provide important information for further studies considering the taxonomic complexity of *A. fraterculus*.

Keywords: *A. fraterculus*, cryptic species, ND6, PCR/RFLP.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas frescas do mundo. Em 2007, o país exportou 918 mil toneladas, 14% a mais do que em 2006, gerando US\$ 642 milhões, sendo 34% acima do valor gerado em 2006 (IBRAF, 2008). É notável a participação das frutas tropicais neste mercado, sendo que a região Nordeste do país é a principal responsável por esta produção (GUERREIRO, 2002). O Estado da Bahia, por possuir diferentes microclimas, oferece condições propícias ao desenvolvimento de cultivos de quase todas as frutas, com rentabilidade acentuada para os cultivos de banana, coco, limão, goiaba, manga, mamão e uva. Desta maneira, são grandes as possibilidades da Bahia tornar-se o principal Estado brasileiro em agricultura irrigada nos próximos 20 anos (GUERREIRO, 2002). Porém, apesar da grande quantidade de frutas que são produzidas, sua comercialização encontra barreiras quarentenárias devido ao risco de introdução de pragas e doenças nos países importadores (NACHEINER et al., 2003) .

As moscas-das-frutas estão entre as principais pragas da fruticultura brasileira, causando perdas significativas à produção e limitando o livre comércio de frutas frescas. Estes insetos causam danos diretos devido ao fato das fêmeas realizarem oviposição no epicarpo ou mesocarpo do fruto e das larvas alimentarem-se da polpa do fruto causando o apodrecimento do mesmo



(MALAVASI, 2000). As espécies de moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil pertencem a dois gêneros: *Anastrepha* e *Ceratitis*. O gênero *Ceratitis* está representado por uma única espécie, a mosca do mediterrâneo, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), enquanto o gênero *Anastrepha* possui 99 espécies registradas no Brasil (ZUCCHI, 2000a; 2007).

Na Bahia, 31 espécies do gênero *Anastrepha* já foram identificadas, dentre estas as espécies mais comuns são: *A. distincta* (Greene), *A. fraterculus*, *A. sororcula* (Zucchi) e *A. obliqua* (Macquart) (NASCIMENTO et al., 1981; ZUCCHI, 2007). A espécie predominante pode variar em diferentes regiões do Estado devido a fatores como presença de hospedeiros primários, inimigos naturais e pluviosidade (NASCIMENTO E CARVALHO, 2000a). *A. fraterculus* é considerada uma das espécies mais polífagas de moscas-das-frutas, infestando 76 espécies de hospedeiros em 20 famílias botânicas, muitos destes de importância econômica (ZUCCHI, 2007). Vários estudos evidenciaram diferenças genéticas, biológicas e morfométricas em *A. fraterculus*, demonstrando a existência de um complexo de espécies crípticas dentro desta espécie (BUSH, 1962; MORGANTE et al., 1980; STECK, 1991; SELIVON, 1996; McPHERON et al., 1999; SMITH-CALDAS et al., 2001; BARR, 2005; SELIVON et al., 2005).

O reconhecimento de complexos de espécies crípticas é extremamente importante tanto para responder questões evolutivas básicas, como para auxiliar programas de manejo e controle (McPHERON, 2000). O advento das técnicas moleculares proporcionou a descoberta de vários complexos de espécies crípticas, principalmente em artrópodes (BICKFORD et al., 2007). Avise (2004) revisa vários exemplos do uso de marcadores genéticos no diagnóstico de espécies crípticas, entre eles as isoenzimas, RAPD (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente), RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição), além do sequenciamento de genes mitocondriais e nucleares e de elementos transponíveis.

Vários estudos indicam que a população de *A. fraterculus* do México é diferente morfologicamente e geneticamente das populações da América do Sul (BUSH, 1962; SMITH-CALDAS et al., 2001; HERNANDEZ-ORTIZ et al.,

2004) , assim como há diferenças entre as populações de baixas e altas altitudes da Venezuela e Colômbia (STECK, 1991; McPHERON et al., 1999; SMITH-CALDAS et al., 2001). Na Argentina e Sul do Brasil, os dados moleculares e citogenéticos indicaram a existência de uma única espécie (ALBERTI et al., 2002; BASSO et al., 2003; ALBERTI et al., 2007). As populações brasileiras estudadas incluíram um maior número de amostras do Estado de São Paulo, onde pelo menos três espécies crípticas foram caracterizadas por dados citogenéticos, moleculares, morfométricos e de cruzamentos (SELIVON et al., 2005).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2. 1. Espécies crípticas**

As espécies são unidades fundamentais em estudos sobre biogeografia, ecologia, macroevolução e conservação biológica (SITES et al., 2004) e vários conceitos de espécies têm sido propostos (FUTUYMA, 2005). O conceito fenético define espécie como o conjunto de indivíduos que são morfologicamente semelhantes e diferentes de outros conjuntos de indivíduos (RIDLEY, 2006). O conceito biológico proposto por Mayr (1942) define espécie como “grupos de populações reais ou potencialmente intercruzantes que estão reprodutivamente isoladas de outros grupos”. De acordo com Cracraft (1989), espécie pode ser definida como “o menor agrupamento diagnosticável de organismos individuais, dentro dos quais há um padrão de ancestralidade e descendência”, configurando, assim o conceito filogenético.

Segundo Ridley (2006), as espécies são identificadas principalmente por suas características morfológicas. Algumas espécies podem exibir diferenças comportamentais, ecológicas e genéticas e não apresentar distinção morfológica sendo denominadas de espécies crípticas, ou seja, estas espécies são isoladas reprodutivamente, mas não morfologicamente (MAYR, 2001; RIDLEY, 2006).

Complexos de espécies crípticas são comuns em vários grupos tais como peixes, anfíbios, insetos, fungos e plantas (BICKFORD et al., 2007). O surgimento de espécies crípticas em alguns desses táxons pode ser explicado por três hipóteses. A primeira hipótese afirma que a mudança em características morfológicas pode não ocorrer devido a um recente processo de especiação (LANDRY et al., 2003). De acordo com a segunda hipótese, táxons que utilizam algum tipo de sinal como vocalizações e feromônios para o reconhecimento dos parceiros compreendem um grande número de espécies crípticas, pois a mudança nesses sinais pode não refletir em uma mudança morfológica (BICKFORD et al., 2007). A terceira hipótese postula que alguns grupos não apresentam características morfológicas que possam ser utilizadas para a distinção das espécies, como ocorre em certas espécies de esponjas e nematódeos (KLAUTAU et al., 1999; BLOUÍN, 2002).

Segundo Bickford et al. (2007), um dos grupos mais representativos em número de espécies crípticas são os artrópodes. Em dípteros, os estudos concentram-se principalmente nos grupos que apresentam importância médica e econômica (BERLOCHER, 1984).

O gênero *Anopheles* (Diptera: Culicidae) contém aproximadamente 500 espécies descritas que podem ser encontradas em todos continentes, exceto na Antártica. É um dos grupos mais estudados de insetos devido à sua importância médica como vetor de várias doenças como a malária e filaríase. Espécies crípticas foram reconhecidas neste gênero e geralmente estes complexos diferem na capacidade de transmitir a malária e na resistência a alguns inseticidas (KRZYWINSKI e BESANSKY, 2003). Favia et al. (1997) confirmaram a existência de complexos de espécies crípticas em *Anopheles gambiae* Giles, principal vetor da malária na África, com o uso da técnica de PCR-RFLP, identificando duas formas geneticamente distintas. Estudos citogenéticos e moleculares posteriores mostraram que este complexo de espécies crípticas apresenta distribuição geográfica e adaptações distintas para diversos habitats (della TORRE et al., 2001; della TORRE, 2005). Outros complexos de espécies crípticas foram estudados dentro do gênero *Anopheles* entre eles estão: *An. minimus* Theobald (BORTEL et al., 2000), *An. funestus*

Giles (MICHEL et al., 2006), *An.nuneztovari* Galaldon (ONYABE e CONN, 1999) e *An.albitarsis* Arribalzaga (LEHR et al., 2005).

Complexos de espécies crípticas já foram identificados em vários grupos de insetos-praga (McPHERON, 2000). Clarke et al. (2005), revisaram estudos a respeito do complexo *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae: Dacinae). Atualmente, este complexo compreende 75 espécies crípticas, a maioria destas apresenta distribuição restrita, concentrando-se principalmente na Ásia tropical, Austrália e Ilhas do Pacífico e apresenta ocorrência secundária na Ásia temperada, África tropical, sul da Europa e norte da América do Sul (WHITE; ELSON-HARRIS, 1992; NORRBOM, 2004). Contudo as espécies *B. dorsalis* “sensu stricto” Bezzi, *B. carambolae* Drew e Hancock, *B. philippinensis* Drew e Hancock e *B. papayae* Drew e Hancock são consideradas invasoras. O conhecimento de métodos para identificar este complexo é extremamente importante para programas quarentenários. Na Austrália, Nova Zelândia e Estados Unidos, ferramentas moleculares têm sido utilizadas para identificar estágios imaturos e tentar assim evitar a colonização destas áreas pelas referidas espécies.

No gênero *Rhagoletis*, o grupo *pomonella* (Diptera:Tephritidae), é constituído por espécies morfológicamente similares que apresentam especificidade por hospedeiros diferentes, encontra-se distribuído na Europa, Ásia temperada e Américas (NORRBOM, 2004). Dentro desse grupo, existem quatro espécies descritas, *R. pomonella* Walsh, *R. mendax* Curran, *R. zephyria* Snow e *R. cornivora* Bush, três espécies ainda não descritas, “*Cornus florida* fly” , “*Vaccinium arboreum* fly” e “*Lonicera* fly” e três populações indeterminadas (“*Prunus domestica* fly”, “*Crataegus opaca* fly” e uma população do México de *R. pomonella*). O hospedeiro primário de *R. pomonella* é *Crataegus* spp. Após a introdução da maçã na América do Norte no século XIX, houve a colonização deste novo hospedeiros por *R. pomonella* . Estudos realizados no século XX, verificaram que as larvas de *R. pomonella* que infestavam maçã exibiam diferenças genéticas, de sinais químicos e diapausa, levando ao isolamento reprodutivo entre essas populações simpátricas infestando dois hospedeiros diferentes. A descoberta dessas raças-hospedeiro

proporcionou a identificação dos outros membros que compõe o complexo *R. pomonella* (BIERBAUM e BUSH, 1990; SMITH e BUSH, 1997; SCHWARZ et al., 2005).

Uma das hipóteses existentes para explicar a evolução simpátrica em *R. pomonella*, postula que as inversões cromossômicas encontradas nas populações dos Estados Unidos e México representam um polimorfismo ancestral e as inversões nos cromossomos 1 e 3 estão relacionadas com o período de diapausa destas espécies. Descobriu-se que as populações de *R. pomonella* que infestavam maçã são mais relacionadas às populações de *R. pomonella* do México do que às populações simpátricas que infestam *Crataegus* spp. Portanto, a diferenciação encontrada no grupo *pomonella* é resultado em parte de uma variação ancestral pré-existente, seguida de uma rápida mudança de adaptações pelo uso de um novo hospedeiro (FEDER et al., 2003; JIGGINS e BRIDLE, 2004).

## **2.2. Moscas-das-frutas**

A ordem Diptera possui 120.000 espécies agrupadas em 188 famílias, com algumas destas espécies apresentando grande importância médica e econômica (TOMPSON, 2007). Dentre as famílias de dípteros de importância econômica, destaca-se a família Tephritidae. As larvas das espécies desta família podem desenvolver-se em sementes, ramos, folhas e flores, mas aproximadamente 35% das espécies atacam frutos carnosos, sendo conhecidas como moscas-das-frutas (WHITE e ELSON-HARRIS, 1992; DIAZ-FLEISCHER E ALUJA, 1999).

A família Tephritidae inclui 4.452 espécies reconhecidas e agrupadas em 484 gêneros, distribuí-se em todas as regiões tropicais e temperadas do mundo, representando uma das maiores famílias da ordem Diptera. Estes números podem ainda aumentar, pois existem muitas espécies ainda não descritas (NORRBOM, 2004; URAMOTO, 2007). Seis gêneros da família Tephritidae possuem espécies de importância econômica: *Anastrepha*,

*Bactrocera*, *Ceratitis*, *Dacus*, *Rhagoletis* e *Toxotrypana* (MALAVASI et al., 2000).

O gênero *Anastrepha* é endêmico do Novo Mundo e restrito a regiões tropicais e subtropicais. Está estabelecido na América do Norte (sul dos Estados Unidos, Texas e México), América Central e Caribe e na América do Sul, exceto no Chile onde algumas espécies são registradas esporadicamente em algumas áreas ao norte do deserto de Atacama na fronteira com o Peru e no norte da Argentina (ALUJA, 1994; MALAVASI et al., 2000).

No continente americano, o Brasil é o país que apresenta maior diversidade de espécies de *Anastrepha*, 99 espécies, das quais sete são importantes do ponto de vista econômico – *A. fraterculus* (Wiedemann), *A. grandis* (Macquart), *A. obliqua* (Macquart), *A. pseudoparalella* (Loew), *A. sororcula* Zucchi, *A. striata* Schiner e *A. zenildae* Zucchi (ZUCCHI, 2000a; ZUCCHI 2007).

Malavasi et al. (1980) realizaram um trabalho pioneiro para determinar a ocorrência de espécies de *Anastrepha* e *Ceratitis capitata* em diferentes regiões do Brasil e associá-las a seus principais hospedeiros. As famílias de plantas com maior índice de infestação foram: Myrtaceae (10 espécies), Anacardiaceae (oito espécies), Rosaceae (sete espécies) e Rutaceae (sete espécies). Os autores concluíram que as espécies de *Anastrepha* apresentam preferência por diversos hospedeiros nativos enquanto *C. capitata* geralmente infesta espécies de frutos introduzidos, mas apesar desta preferência, já existe uma adaptação de *C. capitata* a frutos nativos e de *Anastrepha* a frutos introduzidos.

O ciclo de vida é muito similar entre as espécies do gênero *Anastrepha* cuja biologia é conhecida (ALUJA, 1994). Após a cópula, a fêmea reconhece o local para a oviposição realizando movimentos ativos de reconhecimento, deposita seus ovos no epicarpo ou mesocarpo do fruto. Cerca de dois dias após a oviposição, as larvas eclodem e alimentam-se da polpa do fruto. As larvas no terceiro estadio abandonam os frutos e enterram-se no solo, para a pupação por aproximadamente 10 a 15 dias, para em seguida emergir os

adultos que começam um novo ciclo reprodutivo (BARRROS et al., 1983; CARVALHO, 2005).

A identificação das espécies do gênero *Anastrepha* é feita principalmente por características do mesonoto, mediotergito e subescutelo, nervura das asas, sintergosternito, membrana eversível e ápice do acúleo. A morfologia do acúleo: formato, largura, comprimento, a presença e o posicionamento dos dentes e o número de dentes são as principais características na identificação de espécies do gênero *Anastrepha* (ZUCCHI, 2000a).

Norrbom et al. (2000), com base em caracteres morfológicos, agruparam as 197 espécies do gênero *Anastrepha* então descritas, em 17 grupos: *benjamini*, *cryptostrepha*, *daciformis*, *dentata*, *doryphoros*, *fraterculus*, *grandis*, *leptozona*, *mucronata*, *pseudoparalela*, *punctata*, *ramosa*, *robusta*, *schausi*, *serpentina*, *spatulata* e *striata*. Um total de 32 espécies não foi incluído em nenhum grupo.

O gênero *Anastrepha* é bastante recente para apresentar coevolução com plantas hospedeiras, contudo as associações de algumas espécies com seus hospedeiros refletem uma relação filogenética entre as espécies do gênero, por exemplo, *A. cordata* Aldrich, *A. hamata* Loew e *A. creba* Stone são espécies próximas e basais do gênero *Anastrepha* que utilizam sementes como hospedeiro ou plantas da família Apocynaceae, Asclepiadaceae e Sapotaceae (plantas que produzem látex), o que pode indicar que estas famílias botânicas podem ter sido hospedeiros ancestrais de *Anastrepha*. Enquanto espécies derivadas especializaram-se em utilizar a polpa dos frutos e são polípagas, como exemplo espécies do grupo *fraterculus* (ALUJA, 1994; NORRBOM et al., 2000; ALUJA e MANGAN, 2008).

Estudos filogenéticos utilizando seqüências dos genes mitocondriais 16S RNAr e COI, e do gene nuclear *period*, corroboram os dados morfológicos no agrupamento das espécies do gênero *Anastrepha* em 17 grupos infragenéricos, porém os estudos questionam a monofilia dos grupos: *cryptostrepha*,



*fraterculus*, *pseudoparallela* e *spatulata* (McPHERON et al., 1999; SMITH-CALDAS et al., 2001; BARR et al., 2005).

O grupo *cryptostrepha* apresenta similaridade morfológica com o grupo *punctata*, os dados moleculares unem *A. panamensis* Greene (grupo: *cryptostrepha*) com *A. punctata* Hendel (grupo: *punctata*) enquanto outra espécie do grupo incluída nos estudos moleculares aparece na base da árvore filogenética. Para o grupo *fraterculus* ser considerado monofilético, é necessário a exclusão da espécie *A. barbiellini* Lima, a qual foi incluída no grupo com base em características morfológicas. Com relação ao grupo *pseudoparallela*, *A. dryas* Stone está agrupada próximo à *A. belicauda* Norrbom (grupo *schausi*) e distante de outras espécies do grupo *pseudoparallela*. O grupo *spatulata* apresenta-se parafilético, *A. spatulata* Stone não foi agrupada com o restante do grupo em ambas as análises moleculares e nas análises morfológicas (McPHERON et al., 1999; BARR et al., 2005). Os referidos estudos filogenéticos com base em sequenciamento de DNA sugerem ainda a inclusão de *A. acris* Stone (espécie sem grupo definido pelas análises morfológicas) no grupo *fraterculus* (McPHERON et al., 1999; SMITH-CALDAS et al., 2001; BARR et al., 2005).

O grupo *fraterculus* é atualmente composto por 29 espécies (NORRBOM et al., 1999), das quais 17 ocorrem no Brasil: *A. amita* Zucchi, *A. antunesi* Lima, *A. bahiensis* Lima, *A. barbiellini* Lima, *A. coronilli* Carejo e Gonzalez, *A. distincta*, *A. fischeri* Lima, *A. fraterculus*, *A. matertela* Zucchi, *A. minensis* Lima, *A. obliqua*, *A. perdita* Stone, *A. quiana* Stone, *A. sororcula*, *A. tenella* Zucchi, *A. turpiniae* Stone e *A. zenildae* Zucchi (ZUCCHI, 2007).

As espécies do grupo *fraterculus* são identificadas morfológicamente por características sutis no ápice do acúleo. Araújo e Zucchi (2006) relatam que pode haver variação nos tamanhos do acúleo e do ápice do acúleo e sobreposição dessas medidas em: *A. fraterculus*, *A. obliqua*, *A. sororcula*, *A. turpiniae* e *A. zenildae*. Esta variação foi encontrada em exemplares obtidos da mesma espécie de hospedeiro e de diferentes regiões do Brasil. De acordo com estes autores é preciso critério ao examinar estas características em

moscas-das-frutas para que não ocorra a identificação incorreta dos exemplares.

O grupo *fraterculus* está distribuído desde o Texas até o Norte da Argentina, com duas espécies ocorrendo nas Antilhas (NORRBOM, 2000) e compreende a maioria das espécies de importância econômica que infestam uma grande variedade de hospedeiros (ZUCCHI, 2000b). *A. fraterculus*, *A. obliqua* e *A. sorocula* são as espécies de maior importância econômica no Brasil infestando principalmente frutos da família Myrtaceae (*A. fraterculus* e *A. sorocula*) e Anarcadiaceae (*A. obliqua*) (MALAVASI et al., 1980). Malavasi et al. (2000), destacam que “Em termos de taxonomia, comportamento e genética, *A. fraterculus* é a espécie mais intrigante e têm sido alvo de vários estudos”.

### **2.3. *Anastrepha fraterculus*, um complexo de espécies crípticas**

*Anastrepha fraterculus* é considerada a espécie mais importante dentro do gênero *Anastrepha*, infestando 76 espécies de diferentes famílias de plantas hospedeiras (Zucchi, 2007). Esta espécie ocorre desde o sul do Texas até o norte da Argentina (MALAVASI et al., 2000). No Brasil é amplamente distribuída ocorrendo em todos os Estados do sul e sudeste, centro-oeste (com exceção do Mato Grosso) e nordeste (com exceção de Sergipe, onde não existem levantamentos de espécies de *Anastrepha*), no norte do país apenas nos Estados do Amapá e Tocantins foi registrada a ocorrência de *A. fraterculus* (MALAVASI et al., 2000; ZUCCHI, 2007).

No Estado da Bahia, Nascimento e Carvalho (2000b) apresentam dados de dinâmica populacional de quatro regiões fisiográficas do Estado da Bahia. No Recôncavo Sul, a predominância é de *A. fraterculus*, *A. obliqua* e *A. sorocula* (onde mais de 98% dos espécimes capturados pertencem a estas três espécies), na região de Serra Geral, o predomínio foi de *C. capitata* (99,39%), na região Nordeste o gênero *Anastrepha* predomina com frequência de 99,79%, sendo que a *A. sorocula* apresentou a maior frequência (97,03%) e na região do Sub-médio São Francisco, as espécies de *Anastrepha*, as de maior frequência foram: *A. obliqua*, *A. pickeli*, *A. dissimilis* e *A. sorocula*. Nas

áreas urbanas houve predominância de *C. capitata* devido à presença do hospedeiro *Terminalia catappa* (chapéu-de-sol).

O reconhecimento do complexo de espécies crípticas em *A. fraterculus* foi demonstrado em vários trabalhos (BUSH, 1962; MORGANTE et al., 1980; STECK, 1991; SELIVON, 1996; McPHERON et al., 1999; SMITH-CALDAS et al., 2001; BARR, 2005).

Estudos citogenéticos em *A. fraterculus* revelaram diferenças no tamanho dos cromossomos sexuais. Bush (1962) constatou que as populações do México não apresentavam diferença no tamanho dos cromossomos X e Y, enquanto as populações provenientes do Brasil exibiam heteromorfismo nestes cromossomos. Esse autor propõe que esse resultado reflete ou um polimorfismo cromossômico ou a existência de um complexo de espécies crípticas.

Morgante et al. (1980) fizeram uma análise com 11 locos isoenzimáticos de 16 populações de *A. fraterculus* da Bahia e de São Paulo que utilizavam diferentes hospedeiros. Esses autores verificaram que existe similaridade genética entre populações separadas por grandes distâncias (2500 km de distância), enquanto populações simpátricas coletadas em diferentes hospedeiros exibiam uma diferenciação genética. Posteriormente, para investigar um possível processo de especiação simpátrica, Malavasi e Morgante (1983) estudaram 11 populações de *A. fraterculus* de diferentes hospedeiros no mesmo pomar, mas os dados isoenzimáticos não detectaram diferenciação genética entre as populações.

Steck (1991) examinou 23 locos isoenzimáticos de populações de *A. fraterculus* das Américas Central e do Sul que infestavam diferentes hospedeiros. Os resultados desse estudo comprovam que *A. fraterculus* trata-se de um complexo de espécies crípticas e pode ser diferenciada em dois grupos baseados na similaridade genética. O grupo I é formado por populações da Bahia, Planície Venezuelana, Costa Rica e México e o grupo II é formado por populações de São Paulo, Andes Venezuelanos e Peru. O autor ainda destaca a forte diferença que existe entre as populações da Venezuela

provenientes de regiões de baixas e altas altitudes, sugerindo que devido à elevação e diferenças climáticas, o fluxo gênico é inexistente entre essas populações e que elas representam, na verdade, duas entidades biológicas diferentes dentro da espécie nominal *A. fraterculus*.

Essa diferença genética entre populações de altas e baixas altitudes também foi constatada pelo estudo filogenético realizado com base no sequenciamento do gene mitocondrial 16S RNAr realizada por McPheron et al. (1999). O estudo mostrou que as populações de *A. fraterculus* do México, Planície Venezuelana e Brasil (Bertioga, São Paulo) são geneticamente semelhantes, enquanto a população de alta altitude de Mérida (Venezuela) é geneticamente distinta de todas essas populações. A amostra do Brasil ficou mais próxima de *A. sororcula* e dos outros membros do grupo *fraterculus*, enquanto a população de Mérida ficou em um clado mais distante.

A análise filogenética realizada por Smith-Caldas et al. (2001), revelou que *A. fraterculus* pode ser um complexo de seis espécies crípticas, formado por populações provenientes dos Andes venezuelanos e colombianos (confirmando os estudos anteriores), Venezuela (baixas altitudes), Guatemala, México, Argentina e populações do sul do Brasil e várias populações de diferentes regiões brasileiras (SILVA e BARR, 2008). Os resultados da técnica de RFLP da região compreendida entre os genes COI e COII com estas amostras apontaram a existência de variação inter e intrapopulacional (amostras de Campinas, Valinhos e Vinhedo - São Paulo) (SMITH-CALDAS, 2001).

As populações de *A. fraterculus* da Argentina e sul do Brasil foram analisadas por Alberti et al. (2002), Basso et al. (2003) e Aberti et al. (2008). Os dados moleculares e citogenéticos evidenciaram que as populações exibem alta similaridade genética, constituindo, portanto, uma única entidade biológica. Petit-Marty et al. (2004), realizaram cruzamentos entre duas populações de diferentes regiões ecológicas da Argentina (Yuto e Concórdia). Os resultados indicaram ausência de isolamento reprodutivo, corroborando os estudos anteriores.

Hernandez-Ortiz et al. (2004) realizaram análises morfométricas em populações do México e América do Sul. Os resultados obtidos mostram que existem diferenças estatísticas significativas entre as populações do México e América do Sul com relação a características do acúleo (comprimento e número de dentes) e morfologia das asas, confirmando as análises genéticas de Smith-Caldas et al. (2001).

Análises morfométricas com diferentes populações brasileiras de *A. fraterculus* revelaram que existe sobreposição nos valores médios do comprimento do acúleo entre *A. fraterculus* (1,58 a 1,76 mm) e as espécies *A. obliqua* (1,50 a 1,66 mm) e *A. sororcula* (1,45 a 1,58 mm), e entre *A. fraterculus* e *A. turpiniae* (1,75 a 1,85) e *A. zenildae* (1,80 a 1,97). Dessa maneira, é preciso analisar criteriosamente as populações de *A. fraterculus* provenientes de diferentes regiões brasileiras e até mesmo de exemplares obtidos do mesmo hospedeiro (ARAUJO e ZUCCHI, 2006).

A caracterização genética, morfométrica e biológica de algumas populações brasileiras de *A. fraterculus* foram realizadas por Selivon et al. (2005). Na análise isoenzimática, as populações formaram dois agrupamentos distintos: Grupo I reúne populações coletadas em locais de maior altitude (Baurú-SP, Louveira-SP, Santa Isabel-SP, Vacaria-RS e Sete Lagoas-MG), com exceção da população coletada em São Sebastião (SP) (1m de altitude) e o Grupo II reúne populações coletadas em localidades de baixas altitudes (Conceição do Almeida-BA, São Sebastião-SP, Natal-RN), com exceção da população de Santa Isabel que infestava laranja. As populações pertencentes a estes dois grupos apresentavam diferenças isoenzimáticas significativas, em nível de espécies distintas. Análises citogenéticas indicaram que as amostras provenientes da Bahia exibiram cromossomos similares à população do México analisadas por Bush (1962). Os dados morfométricos, do padrão alar e do ápice do acúleo confirmam os dados isoenzimáticos e citogenéticos na separação das amostras em dois grupos. Nos experimentos de cruzamentos entre os Grupos I e II, foi verificado que as taxas de eclosão dos ovos foram significativamente baixas. Assim, o estudo caracteriza duas entidades

biológicas distintas dentro da espécie nominal *A. fraterculus* (*A. sp1 aff. fraterculus* e *A. sp2 aff. fraterculus*).

Dados genéticos e morfológicos posteriores revelaram a existência de duas espécies adicionais dentro do complexo *fraterculus*, *A. sp3 aff. fraterculus* e *A. sp4 aff. fraterculus* provenientes do Brasil e Equador, respectivamente. As entidades diferenciam-se em características morfológicas dos ovos e padrão de bandamento dos cromossomos sexuais (SELIVON e PERONDINI, 1998; SELIVON et al., 2004; SELIVON et al., 2005; GODAY et al., 2006).

#### **2.4. Características do DNA mitocondrial animal**

Normalmente o DNA mitocondrial animal é uma molécula circular fechada, possuindo de 15 a 20 kilobases de comprimento e composta de 37 genes, que codificam 22 tRNAs (RNAs transportadores), 2 RNAr (RNAs ribossomais) e 13 mRNAs (RNAs mensageiros) responsáveis pela síntese de proteínas envolvidas no transporte de elétrons e na fosforilação oxidativa (MITROFANOV et al., 2002; AVISE, 2004). Íntrons, grandes famílias de DNA repetitivo, pseudogenes e longas seqüências espaçadoras entre os genes são raras ou ausentes em muitas espécies. Uma região controle de 1kb inicia a transcrição e a replicação do DNAmít, em insetos esta região é rica em adenina e timina (mais de 85%). O tamanho da região controle varia consideravelmente em diferentes taxa (AVISE 2004; ZHANG e HEWITT, 1997; MITROFANOV et al., 2002).

Com exceção de certas famílias de bivalves, a herança predominantemente materna do DNA mitocondrial é regra em todas as espécies de animais (ROKAS et al., 2003). Entre os mecanismos de bloqueio das mitocôndrias paternas estão: i) a degradação do DNA mitocondrial durante a gametogênese, ii) durante o processo de fertilização, as mitocôndrias não penetram no ovócito e iii) após a fertilização, as mitocôndrias paternas são destruídas devido à ação de proteínas como a ubiquitina (BIRK, 2001; ROKAS et al., 2003). Kondo et al. (1990), utilizando a técnica de Southern Blot, verificaram a presença de DNA mitocondrial paterno em cruzamentos entre as espécies *Drosophila simulans* Stutevant e *Drosophila mauritiana* Tsacas e

David. A falta de um mecanismo para o reconhecimento de mitocôndrias paternas pode ser comum em populações de híbridos, onde a especificidade no processo de reconhecimento pode ser ineficaz (ROKAS et al., 2003).

Devido à herança uniparental os genes mitocondriais raramente se recombinam (BIRKY, 2001). Contudo, Rokas et al. (2003), revisaram algumas espécies de nematóides e moluscos que possuem um sistema de recombinação no DNA mitocondrial. A recombinação intermolecular não-homóloga foi observada na região controle de nematóides enquanto que em bivalves, dois tipos de DNAmít são encontrados, em fêmeas (tipo F) e machos (tipo M), foi possível observar recombinação homóloga entre esses dois tipos de moléculas em machos (LADOUKAKIS e ZOUROS, 2001; ROKAS et al., 2003).

A taxa de evolução de alguns genes mitocondriais pode ser de cinco a dez vezes mais rápida quando comparada àquela dos genes nucleares (SIMON et al., 2006). As altas taxas de mutação encontradas no DNAmít podem ser devido aos seguintes fatores: ineficiência dos mecanismos de reparo, pois todas as enzimas responsáveis pelo processo de reparo são codificadas pelo DNA nuclear e depois importadas para as mitocôndrias, exposição a radicais livres produzidos durante o processo de respiração celular e a ausência de histonas que exercem um papel de proteção no DNA nuclear. Porém a maioria destas mutações são sinônimas (não resultam na mudança de aminoácidos) ou inserções e deleções em regiões não codificantes (YAKES e VAN HOUTEN, 1997; ARIAS e INFANTE-MALACHIAS, 2001; CALCAGNOTTO, 2001; AVISE, 2004).

Um evento de mutação no DNAmít pode estar presente em todas as células do organismo. Dessa maneira, durante o processo de divisão celular todas as células filhas terão mitocôndrias com o mesmo DNA mitocondrial mutante, esse evento é conhecido como homoplasia. Contudo, um mesmo indivíduo pode possuir mais de um genótipo mitocondrial. Este fenômeno, conhecido como heteroplasma, pode decorrer devido à mutação no genoma de uma ou mais mitocôndrias, gerando uma mistura de moléculas mutantes e normais. Quando uma célula heteroplásmica divide-se, a herança mitocondrial

nas células filhas ocorre ao acaso. Este processo pode se desenvolver em uma célula somática ou germinativa (RAND, 2001).

Para a maioria das células, a replicação do DNA mitocondrial não é limitada a fase S do ciclo celular, quando o DNA nuclear replica-se, mas ocorre ao longo de todo o ciclo celular (ALBERTS et al., 2006), desta maneira as mitocôndrias são semi-autônomas da estrutura celular (MITROFANOV et al., 2002).

O tamanho reduzido e um alto número de cópias na célula, a ausência de íntrons e de recombinação, a transmissão materna na maioria das espécies de animais, alta taxas de mutações, além da existência de *primers* universais, permitiu que os genes mitocondriais fossem utilizados como marcadores genéticos em estudos populacionais, biogeográficos e filogenéticos (AVISE, 2004; HURST e JIGGINS, 2005; SIMON et al., 2006).

## **2.5. DNA mitocondrial como marcador genético**

As diferentes técnicas para análise de DNAmít disponíveis atualmente diferem com relação à natureza da informação que revelam e no segmento do genoma que é examinado (HARRISON, 1989). A técnica de RFLP utilizando o DNAmít tem sido amplamente utilizada principalmente em estudos intra e interespecíficos. (ARIAS e INFANTE- MALACHIAS, 2001).

A técnica de RFLP detecta eventos de substituições, inserções e deleções de bases utilizando endonucleases de restrição, isto é, enzimas isoladas de bactérias que clivam a molécula de DNA em uma seqüência específica, comumente 4-6 pares de base (pb). Dessa maneira, substituições, inserções e deleções podem criar ou eliminar sítios de clivagem para uma determinada enzima alterando assim, o número e o tamanho dos fragmentos (DOWLING et al., 1996).

A análise por RFLP do DNAmít têm fornecido informações relevantes na identificação de indivíduos imaturos, espécies crípticas, colonização e fluxo



gênico (ARIAS e INFANTE- MALACHIAS, 2001; TYSSEN et al., 2005; BARR et al., 2006)

O gênero *Ceratitis* (Diptera: Tephritidae) contém muitas espécies de importância econômica, a identificação das espécies é feita com base em características dos indivíduos adultos, estágios imaturos são difíceis de serem identificados (WHITE e ELSON-HARRIS, 1992). Barr et al. (2006) identificaram indivíduos imaturos de 25 espécies do gênero *Ceratitis* usando a técnica de PCR-RFLP de três genes mitocondriais: gene da subunidade 12 do RNA ribossômico (12S RNAr), gene da subunidade 16 do RNA ribossômico (16S RNAr) e o gene que codifica para a subunidade 6 da NADH-desidrogenase (ND6) digeridos por 12 enzimas de restrição. Os autores destacam ainda a importância do desenvolvimento de técnicas que permitam reconhecer indivíduos imaturos de *Ceratitis*, pois é nesse estágio que as moscas são detectadas nos frutos durante o trânsito de frutos em portos.

Thyssen et al. (2005), avaliaram a utilidade da técnica de PCR-RFLP na diferenciação das espécies de *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) e *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani) (Diptera: Calliphoridae). O ciclo de vida destas espécies de moscas necrófagas é utilizado na ciência forense para estimar o intervalo pós-morte (IPM). Duas regiões do DNAmít foram amplificadas por PCR, a subunidade I da Citocromo Oxidase (COI) e a região controle, e digeridas com as endonucleases *DraI* e *SspI*, os fragmentos gerados permitiram diferenciar as duas espécies.

A diferenciação de espécies crípticas no gênero *Bombus* (Hymenoptera: Apidae) grupo *lucorum* foi realizada por Murray et al. (2007). Na Europa, cinco espécies de *Bombus* são conhecidas, destas quatro são morfologicamente indistinguíveis: *B. cryptorum* (Fabricius), *B. lucorum* (Linnaeu), *B. magnus* (Vogt) e *B. terrestris* Vikberg. A técnica de PCR-RFLP utilizando o gene COI, permitiu distinguir as quatro espécies do complexo.

Estudos de colonização da espécie *C. capitata* foram realizados na tentativa de esclarecer a sua dispersão em escala mundial. Gasparich et al. (1997) empregaram a técnica da PCR-RFLP para analisar populações de

vários países da América do Sul, Mediterrâneo, África e Austrália, além da Califórnia, Florida e Havaí. Os resultados indicaram uma alta diversidade genética (8 haplótipos) na região sub-Saariana confirmando a hipótese de que a origem da espécie é nessa região. Provavelmente múltiplas introduções podem ter ocorrido na América Central e América do Sul. A introdução na Califórnia não ficou esclarecida neste estudo, o haplótipo observado nesta localidade ocorre em várias regiões incluindo América do Sul e Austrália e em alguns países do Mediterrâneo e África sub-Saariana, além disso, a questão de uma única ou de múltiplas introduções não ficou elucidada. Para esclarecer esta dúvida Meixner et al. (2002), utilizando dados de PCR-RFLP do DNAmít e de microssatélites conseguiram discriminar múltiplas introduções de varias origens de *C. capitata* na Califórnia.

Fairley et al. (2002), analisaram o fluxo gênico entre populações de *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae), no norte do Brasil. Esta espécie ocorre nas costas Atlântica e Pacífica sendo, portanto, tolerante à água salgada. Para testar a hipótese de que o Rio Amazonas funcionaria como uma barreira ao fluxo gênico desta espécie, a técnica de PCR-RFLP utilizando-se o gene mitocondrial COI foi aplicada em cinco populações. Foram identificados 15 haplótipos e dois grupos distintos foram separados pelas análises filogenéticas, com um forte suporte estatístico. Os resultados indicaram que as populações da região Norte constituem uma única e grande população de *An. aquasalis*.

Segundo Hillis et al. (1996), o sequenciamento de genes tem grande aplicação na sistemática molecular como i) no estudo da origem de novos alelos ou de novos *loci* e investigações de convergência e seleção, ii) em estudos intraespecíficos ou estudos populacionais, incluindo estudos de variação geográfica, fluxo gênico, hibridação e conservação biológica e iii) em estudos interespecíficos, como na construção de filogenias de espécies para avaliar o processo de macroevolução.

Boykin et al. (2006), analisaram a distribuição geográfica e preferência por hospedeiros em populações de *A. suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae) em populações da Flórida e do Caribe usando o sequenciamento do gene COI.

Os resultados indicaram a monofilia de *A. suspensa*, não apontando diferenciação genética por regiões geográficas ou por indivíduos que utilizavam diferentes hospedeiros. Os autores destacam ainda que estes dados podem ser úteis na identificação de larvas desta espécie, já que a mesma é considerada de grande importância econômica.

Smith et al. (2006) estudaram espécies de dípteros parasitóides do gênero *Belvosia* que em uma análise morfológica foram classificados como 20 espécies diferentes, sendo três generalistas. Após a análise de seqüências do gene citocromo oxidase I (COI), foram reconhecidas 32 espécies, sendo que as três espécies consideradas generalistas pela identificação morfológica foram identificadas como complexos de espécies crípticas.

Silva (2000) revisou diversos trabalhos que utilizaram métodos moleculares para estudar diferentes espécies da família Tephritidae. Estes marcadores são principalmente aplicados nos estudos de evolução do uso de hospedeiros, estrutura populacional, estudos de colonização, relações filogenéticas e na identificação de estágios imaturos em programas de quarentena e controle.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar se a espécie nominal *A. fraterculus* compreende um complexo de espécies crípticas em diferentes localidades do Estado da Bahia, uma localidade do Espírito Santo e uma localidade de São Paulo, através das técnicas moleculares de PCR-RFLP e do sequenciamento do gene mitocondrial ND6.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- 1- Analisar a distribuição geográfica e a relação com diferentes espécies de hospedeiros das amostras coletadas;
- 2- Identificar espécies de *Anastrepha* que ocorrem em diferentes regiões do Estado da Bahia;
- 3- Analisar variação intra e interpopulacional através da técnica de PCR-RFLP;
- 4- Comparar diferentes indivíduos de *A. fraterculus* através do sequenciamento do gene ND6 para evidenciar a possível ocorrência de complexos de espécies crípticas.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Obtenção e identificação dos exemplares estudados**

Foram realizadas coletas de frutos das famílias Myrtaceae e Rutaceae, nativos e introduzidos, em 27 localidades do Estado da Bahia, uma localidade de São Paulo e uma do Espírito Santo (Figura 1 e Tabela 1). Os frutos foram contados, pesados, colocados em bandejas plásticas contendo vermiculita (substrato de empupação) e cobertos por um tecido de algodão para evitar reinfestação. Semanalmente, as pupas foram coletadas, contadas e colocadas em caixas plásticas contendo vermiculita umedecida. Após a emergência, os adultos foram mantidos no laboratório por uma semana, alimentados com uma dieta artificial (150g de açúcar mascavo, 270g de açúcar, 36g de levedo de cerveja, 3g de sustagen, 60ml de mel e 180ml de hidrolisado de proteína) (SILVA, 1991). A identificação das espécies foi feita com base na análise morfológica das fêmeas adultas, utilizando chaves de identificação (ZUCCHI 1978, 2000a) e confirmadas pelo Dr. Elton Lúcio de Araújo Laboratório de Moscas-das-frutas, Universidade Federal do Semi-Árido, UFERSA, Mossoró, RN. Os espécimes-testemunho estão depositados no Laboratório de Entomologia da UESC.

## **4.2. Extração de DNA total**

Para a extração de ácidos nucléicos, foi utilizada a cabeça de cada indivíduo. O tórax, o abdômen e as asas foram mantidos no Laboratório de Citogenética e Marcadores Moleculares, Universidade Estadual de Santa Cruz, UESC, Ilhéus, BA para estudos morfométricos e genéticos posteriores. A extração de ácidos nucléicos seguiu o protocolo de Han e McPheron (1997), utilizando fenol e clorofórmio.

Tabela 1 – Descrição das localidades e dos hospedeiros coletados

Código	Locais de coleta	Coordenadas	Altitude (m)	Hospedeiro
1	Anagé- BA	14°37'00"S; 41°08'00"O	384	<i>Armadilha</i>
2	Barreiras- BA	12° 8'53.43"S; 44°59'32.92"O	435	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba)
3	Camamu- BA	13°55'52.50"S; 39° 5'38.04"O	1	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba)
4	Eunapólis- BA	16°22'23.15"S; 39°34'30.49"O	189	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba)
5	Gandu- BA	13°45'5.51"S; 39°29'19.17"O	200	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba) <i>Eugenia uniflora</i> (Pitanga)
6	Ibirataia- BA	14°4'13.30"S; 39°38'14.67"O	141	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba)
7	Ilhéus- BA	14°47'50.21"S; 39° 2'7.88"O	52	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba)
8	Ipiaú- BA	14° 7'44.65"S; 39°43'31.37"O	135	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba)
9	Itaberaba- BA	12°30'56.80"S; 40°18'14.53"O	280	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba) <i>Armadilha</i>
10	Itabuna- BA	14°47'21.14"S; 39°16'39.87"O	54	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba)
11	Itacaré- BA	14°17'12.62"S; 38°59'56.40"O	29	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba)
12	Itapetinga- BA	15°14'55.79"S; 40°14'54.54"O	279	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba)
13	Itapé -BA	14°54'4.28"S; 39°25'47.93"O	40	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba)
14	Itiruçu- BA	13°31'23.34"S; 40° 8'40.27"O	900	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba)
15	Ituberá	39° 14' 92"S; 39°73'22"O	27	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba)
16	Jacobina- BA	11°11'7.63"S; 40°32'9.88"O	463	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba) <i>Psidium guineense</i> (Araçá)
17	Jitaúna- BA	14° 1'0.00"S; 39°57'0.00"O	165	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba)
18	Juazeiro- BA	9°26'18.48"S; 40°30'18.81"O	368	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba)
19	Laranjal Paulista- SP	23° 3'12.60"S; 47°50'2.58"O	536	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba)
20	Livramento de Nossa Senhora - BA	13°39'00"S; 41°50'00"O	500	<i>Armadilha</i>
21	Milagres- BA	12°53'0.46"S; 39°50'56.55"O	419	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba)
22	Nova Ibiá- BA	13°48'0.00"S; 39°35'0.00"O	292	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba)
23	Porto Seguro- BA	16°27'3.98"S; 39° 3'52.57"O	4	<i>Syzygium malaccensis</i> (Jambo vermelho)

---

				<i>Psidium guajava</i> (Goiaba) <i>Citrus sinensis</i> (Laranja)
24	Taperoá- BA	13°32'11.08"S; 39° 5'25.91"O	15	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba)
25	Ubaíra- BA	13°15'35.32"S; 39°39'33.51"O	324	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba)
26	Una- BA	15°10'53.26"S; 39° 0'39.47"O	28	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba) <i>Eugenia uniflora</i> (Pitanga) <i>Psidium guineense</i> (Araçá) <i>Syzygium malaccensis</i> (Jambo vermelho) <i>Spondias lutea</i> (Cajá)
27	Valença- BA	13°22'26.49"S; 39° 4'3.36"O	39	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba)  <i>Eugenia uniflora</i> (Pitanga)  <i>Myciaria cauliflora</i> (Jabuticaba)
28	Santa Maria da Vitória - BA	11°00'00"S; 44°31'00"O	440	<i>Armadilha</i>
29	São Mateus- ES	18°42'58" S; 39°51'32" O	36	<i>Psidium guineense</i> (Araçá)
30	Wenceslau Guimarães- BA	13°41'41.00"S; 39°28'28.00"O	178	<i>Psidium guajava</i> (Goiaba)

---



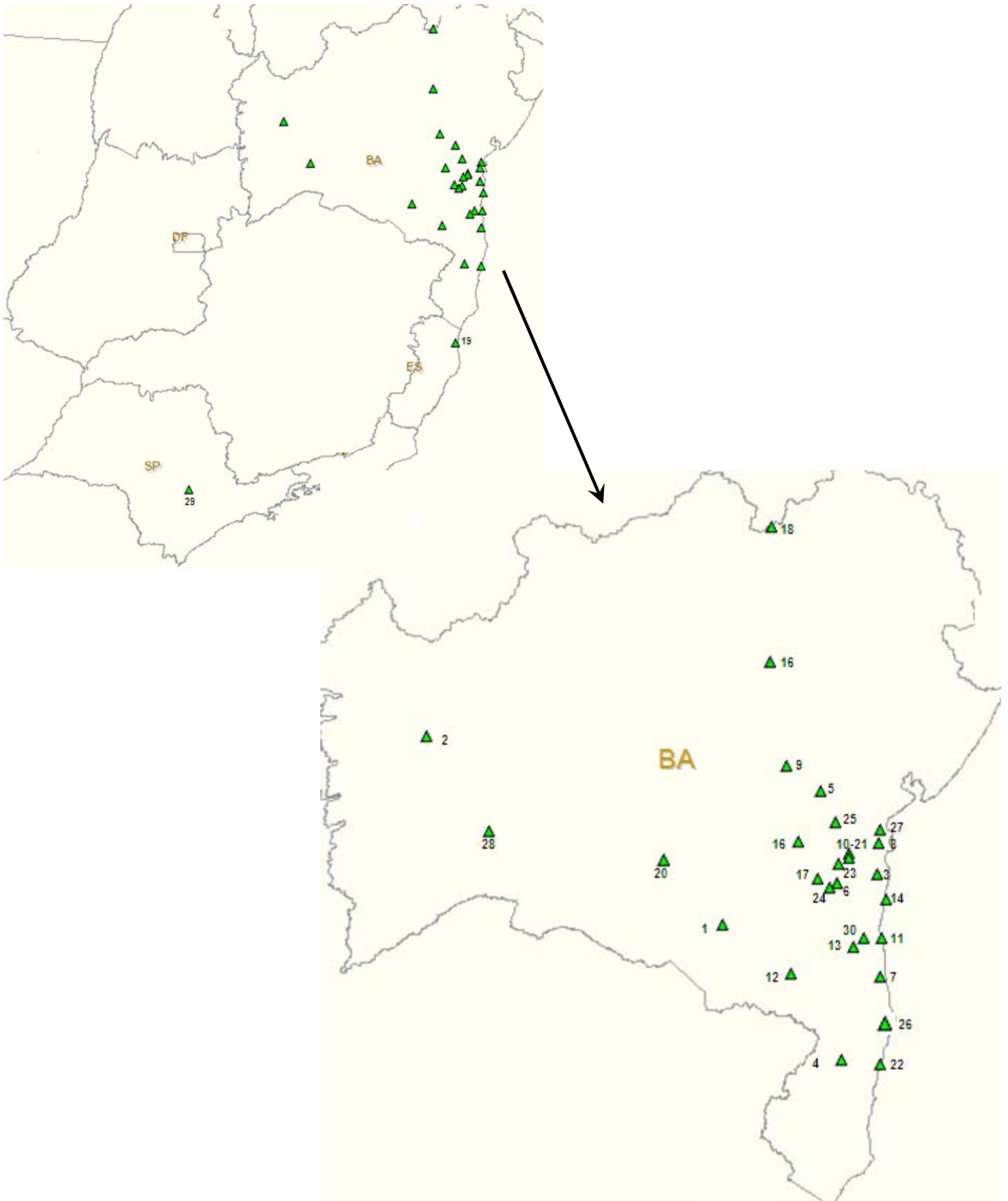


Figura 1- Mapa mostrando os locais de coleta de moscas-das-frutas em três Estados do Brasil em destaque o Estado da Bahia. Os números correspondem às localidades descritas na Tabela 1.

### 4.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O gene mitocondrial ND6 (subunidade 6 da NADH desidrogenase) (Figura 2) foi selecionado com base nas informações obtidas sobre o seu nível de variação e por estudos anteriores realizados com a espécie *A. ludens* (Silva, comunicação pessoal). Os *primers* TTJ-9886 e ND6-r (RUIZ-ARCE e McPHERON, comunicação pessoal) amplificam um fragmento de 740 pares de bases (pb) que compreende o gene para o RNA transportador da treonina (RNAt<sup>Thr</sup>), o gene para o RNA transportador da prolina (RNAt<sup>Pro</sup>) e o gene ND6. Neste trabalho, esse fragmento será citado como gene ND6, pois a maior parte do fragmento amplificado compreende toda a extensão deste gene. As seqüências dos *primers* estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2- Seqüências dos *primers* utilizados para amplificar o gene ND6

Regiões	"Primers"	Seqüências	Sentido
ND6 (740pb)	TTJ-9886	5'..TAAAAACATTGGTCTTGTA..3'	<i>Forward</i>
	ND6-r	5'..TTATGATCCAAAATTTTCATCA..3'	<i>Reverse</i>

As reações de PCR foram realizadas em termociclador Gene Amp® PCR System 9700 da Applied Biosystems, utilizando o kit da Taq DNA polimerase da Fermentas Life Sciences. O volume final da reação foi de 25µL: 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM de dNTPs, 3.2 mM primer *forward*, 3.2 mM de primer *reverse*, 1.5 u de Taq polimerase, 1X tampão (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 1,00µl de DNA (1 a 5 ng/ µL). Os ciclos e as temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão utilizadas para amplificação estão listados na Tabela 3.

Tabela 3- Programa utilizado na amplificação do gene ND6

Região	Programa
ND6	94°C por 3 min; 10 ciclos (95°C por 30s, 43°C por 30s, 72°C por 30s); 28 ciclos (95°C por 30s, 48°C por 30s); 72°C por 7min.

Após a reação de PCR, a visualização dos produtos amplificados foi realizada em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (25µg/µl), submetido a 100V por aproximadamente 1 hora. As bandas foram visualizadas no gel através de luz ultravioleta e o gel foi fotografado no EDAS 240 da Kodak. O marcador de peso molecular utilizado foi ΦX174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) (Fermentas Life Sciences). Os produtos de PCR foram estocados em freezer a -20°C.

#### **4.4. PCR-RFLP - gene ND6**

A tabela 4 mostra a descrição dos exemplares de *A. fraterculus* submetidos à técnica de PCR-RFLP (número de indivíduos, localidade e hospedeiro onde foram coletados). As digestões foram compostas por 0,2µL de enzima (1u), 2,0µL de tampão tango, 14,0µL H<sub>2</sub>O deionizada e 4,0µL de produto da PCR, sendo o volume final da reação de 20µL. Os tubos foram incubados à 37°C por 12 horas. As bandas resultantes das digestões foram visualizadas em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (25µg/µL), submetido a uma condição de corrida de 80V por aproximadamente 2 horas. As bandas foram visualizadas no gel através da luz ultravioleta e o gel foi fotografado no EDAS 240 da Kodak. O marcador de peso molecular utilizado foi ΦX174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) da Fermentas Life Sciences.

#### **4.5. Reação de purificação**

Os fragmentos amplificados foram purificados com as enzimas Exonuclease I *Escherichia coli* (EXO I) e Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP), ambas da USB. A mistura para a reação de purificação foi composta por 0,66µL de ExoI, 0,66µL de SAP, 0,68µL de H<sub>2</sub>O deionizada e 12µL de produto de PCR, para um total de seis reações de sequenciamento (três repetições para cada um dos *primers*). A reação foi realizada em um termociclador Gene Amp® PCR System 9700 da Applied Biosystems, com a seguinte programação 37°C por 30 min e 80°C por 15 min para a inativação das enzimas. Ao fim da reação, o produto foi estocado em freezer a -20°C até a utilização para a reação de sequenciamento.

Tabela 4 - Indivíduos analisados nas técnicas de PCR/RFLP e sequenciamento do gene ND6

Localidade	Hospedeiro	Nº de indivíduos PC-RFLP	Nº de indivíduos Sequenciados
Anagé- BA	Armadilha	5	1
Camamu- BA	Goiaba	5	1
Eunapólis- BA	Goiaba	1	-
Gandu- BA	Goiaba	5	-
	Pitanga	1	-
Ibirataia- BA	Goiaba	5	2
Ilhéus- BA	Goiaba	5	-
Ipiaú- BA	Goiaba	5	-
Itabuna- BA	Goiaba	5	3
Itacaré- BA	Goiaba	5	1
Itapetinga- BA	Goiaba	1	-
Itapé-BA	Goiaba	5	-
Itiruçu- BA	Goiaba	5	2
Ituberá- BA	Goiaba	5	1
Jitaúna- BA	Goiaba	5	1
Laranjal Paulista- SP	Goiaba	7	2
Livramento de Nossa Senhora - BA	Armadilha	5	2
Milagres	Goiaba	-	1*
Nova Ibiá- BA	Goiaba	5	-
	Goiaba	5	-
Porto Seguro- BA	Laranja	5	-
	Jambo	5	1
Taperoá- BA	Goiaba	5	2
Ubaíra- BA	Goiaba	1	1
	Araçá	5	-
	Goiaba	5	1
Una- BA	Jambo	5	1
	Pitanga	5	-
	Cajá	-	1 <sup>#</sup>
	Goiaba	5	1
	Jabuticaba	1	1
Valença- BA	Pitanga	1	1
Santa Maria da Vitória - BA	Armadilha	3	1
São Mateus- ES	Araçá	5	3
Wenceslau Guimarães- BA	Goiaba	5	-

\**A. sororcula* e <sup>#</sup> *A. obliqua*

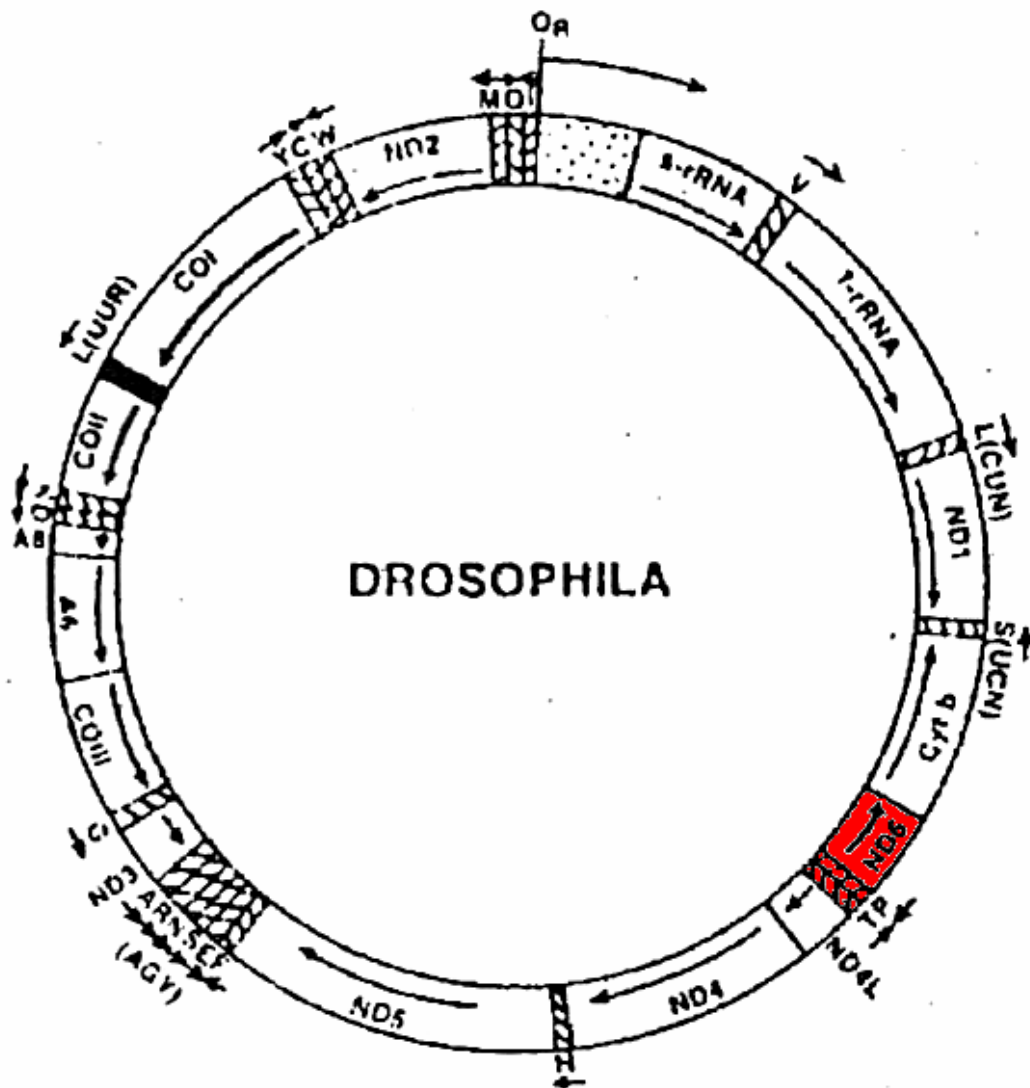


Figura 2- Mapa circular do DNA mit de *Drosophila yakuba* Burla mostrando a localização e a direção da transcrição dos genes (SIMON et al., 1994). Em destaque, os genes  $\text{RNA}^{\text{Pro}}$ ,  $\text{RNA}^{\text{Tre}}$  e gene ND6, utilizados neste trabalho.

## **4.6. Sequenciamento**

### **4.6.1. Reação de Sequenciamento**

Um total de 29 indivíduos de diferentes localidades do Estado da Bahia, Espírito Santo e São Paulo foram seqüenciados (Tabela- 4). A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se o DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit (MegaBACE™) da GE Healthcare. Com a finalidade de otimização da reação de seqüenciamento, vários testes foram feitos, levando-se em conta a quantidade de DNA, bem como o programa utilizado para amplificação. Além disso, para aumentar a confiabilidade dos resultados foram feitas três repetições de cada amostra para os *primers forward* e *reverse*. A reação de amplificação para seqüenciamento foi composta por 1,3 µL de DNA purificado, 0,5 µL de *primer* na concentração de 3,2 mM, 1,2 µL de H<sub>2</sub>O Mili-Q e 2 µL de mix (integrante do kit de seqüenciamento). Esta reação foi feita separadamente com cada *primer*. Em seguida, foram colocadas no termociclador, por 40 ciclos de amplificação, com o seguinte programa: 94°C por 30s, 50°C por 30s e 60°C por 80s. Ao fim do processo, o material foi embrulhado em folha de alumínio e estocado em freezer a -20°C.

### **4.6.2. Obtenção das seqüências**

Os produtos das reações foram submetidos à análise no seqüenciador MegaBACE™ DNA Analysis System 1000 da GE Healthcare. Para isso, os 96 capilares do seqüenciador foram carregados com a matriz de poliacrilamida linear MegaBACE™ Long Read Matrix da GE Healthcare. A injeção das amostras deu-se a 2KV por 90s e a corrida eletroforética foi efetuada a 9KV por 120 min a 44°C com tampão MegaBACE™ 10x Running buffer (GE Healthcare) diluído 10 vezes. As seqüências foram exportadas nos formatos Fasta e SCF com o auxílio do programa MegaBACE™ Sequence Analyzer versão 3.0.0208.1401 (GE Healthcare).

## **4.7. Análise das seqüências**

Os eletroferogramas contendo as seqüências (modo SCF) foram analisados e organizados com o auxílio da ferramenta Seqman do programa

Lasergene 7.0 da DNASTAR®. Seis seqüências, três do *primer forward* e três do *primer reverse*, para cada amostra foram alinhadas e comparadas a fim de obter-se uma seqüência consenso, que em seguida foi exportada e salva no formato FASTA, para posterior alinhamento.

#### 4.8. Análise filogenética

Para a análise filogenética, além das seqüências obtidas neste trabalho foram utilizados dados obtidos por Smith-Caldas (2001) cedidos pelo Dr. Bruce McPherson – Department of Entomology, Penn State University (Tabela 5). A espécie *Anastrepha serpentina* (Wiedemann), pertencente ao grupo *serpentina*, foi utilizada como grupo externo.

Tabela 5 – Lista de espécies e populações do grupo *fraterculus* seqüenciadas por Smith-Caldas (2001), gene ND6.

Espécie	Localidade	Tipo de coleta
<i>A. amita</i>	Santa Inês (MA)	Armadilha
	Cananéia (SP)	Armadilha
	Campinas (SP)	Jambo
	Chapecó (SC)	Armadilha
	Janaúba (MG)	Armadilha
<i>A. fraterculus</i>	Linhares (ES)	Armadilha
	São José da Bela Vista (SP)	Armadilha
	Vacaria (RS)	Armadilha
	Campinas (SP)	Uvaia ( <i>E. pyriformis</i> )
	Janaúba (MG)	<i>S. purpurea</i> (serigüela)
	Linhares (ES)	Armadilha
	<i>A. obliqua</i>	Natal (RN)
	Narandiba (SP)	Armadilha
	Patrocínio Paulista (SP)	<i>Mangifera indica</i> (manga)
	Presidente Prudente (SP)	<i>S. purpurea</i> (serigüela)
	Guará (SP)	Goiaba
<i>A. sororcula</i>	Mossoró (RN)	Armadilha
	Rosana (SP)	Goiaba
	Tabaraí (SP)	Goiaba
<i>A. turpiniae</i>	Santa Inês (MA)	Armadilha
<i>A. zenilidae</i>	Lagoinha (PI)	Armadilha
	Mossoró (RN)	Goiaba

O alinhamento das seqüências de DNA foi feito usando o programa Clustal W implementado no programa *BioEdit* (HALL, 1999), seguido de ajustes manuais. As seqüências alinhadas foram convertidas numa matriz no formato nexus, utilizando-se o programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), versão 4 (TAMURA et al., 2007), e analisadas quanto à composição nucleotídica (Apêndice A) e quanto à divergência das seqüências (Apêndice B). Após o alinhamento as seqüências também foram analisadas pelo programa DNAsp versão 4.2 (ROKAS et al. 2007) com a finalidade de calcular o número de haplótipos nas populações estudadas.

Para a obtenção da árvore filogenética, construiu-se uma matriz de distância baseada no modelo de substituição nucleotídica de Jukes-Cantor (Jukes e Cantor, 1969). Segundo o modelo de Jukes-Cantor, as freqüências de equilíbrio de todas as bases seriam as mesmas e mudanças nucleotídicas ocorreriam na mesma taxa em qualquer sítio ( $A \rightarrow C$ ,  $A \rightarrow G$ ,  $A \rightarrow T$ ,  $C \rightarrow G$ ,  $C \rightarrow T=1$ ) (SCHNEIDER, 2003). De posse dessa matriz, construiu-se uma árvore, utilizando-se o agrupamento do vizinho mais próximo (NJ – *neighbor-joining*) (SAITOU e NEI, 1987), baseando-se na evolução mínima (ME) e na busca seqüencial de vizinhos que minimizasse o comprimento total das árvores (SCHNEIDER, 2003).



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Distribuição e relação com o hospedeiro dos espécimes coletados

Um total de 880 frutos (59,63 kg) pertencentes a seis espécies de plantas hospedeiras de duas famílias botânicas, Rutaceae e Myrtaceae, foi amostrado. Foram obtidas 2254 pupários dos quais emergiram 1.351 moscas-das-frutas (698 fêmeas e 653 machos). A viabilidade pupal foi de 60,21%. Com base em características morfológicas, as fêmeas identificadas pertencem a cinco espécies de moscas-das-frutas: *A. fraterculus*, *A. zenilidae*, *A. sororcula*, *A. obliqua* e *C. capitata* (Tabela - 6), com frequências de 71,63%, 13,75%, 6,73%, 0,14% e 7,59%, respectivamente. Os exemplares coletados na Bahia foram provenientes das regiões norte, centro-sul, oeste, recôncavo, sudoeste, sul e extremo sul do Estado (Figura- 1 e Tabela -6).

A presença de *C. capitata* foi detectada apenas em amostras de regiões do semi-árido em áreas urbanas (por exemplo: Itaberaba, Jacobina), enquanto que as espécies de *Anastrepha* foram encontradas em áreas rurais de pomares comerciais ou domésticos e em áreas urbanas. Um maior número de indivíduos de *A. fraterculus* foi encontrado nas regiões do extremo sul, sul e sudoeste baiano - em localidades de mata atlântica que apresentam clima úmido. Em

Itaberaba, semi-árido baiano, as amostras foram obtidas através de coletas por armadilha McPhail, esta localidade é considerada pólo de fruticultura.

Nas coletas de frutos, foi detectada em algumas localidades a presença de mais de uma espécie de *Anastrepha* infestando a mesma espécie de hospedeiro, principalmente goiaba. Como exemplo, pode-se citar as localidades de Camamu, Gandu, Ibirataia, Ipiaú, Itabuna e Itapé onde foram encontradas as espécies *A. fraterculus*, *A. sororcula* e *A. zenildae*. No extremo sul da Bahia e no município de São Mateus (norte do Espírito Santo) foi verificada apenas a presença de uma espécie - *A. fraterculus* - em diferentes hospedeiros como jambo, goiaba, laranja e araçá.

No município de Laranjal Paulista (São Paulo), foram coletados no mesmo pomar frutos de goiaba infestados por *A. fraterculus* e *A. obliqua*. Nas outras localidades da Bahia e do Espírito Santo, não foi verificada a presença de *A. obliqua* infestando goiabas.

Nas espécies de frutos nativos coletados: *P. guajava* (goiaba), *E. stipitata* (araçá boi), *E. uniflora* (pitanga), *P. guineense* (araçá) e *M. cauliflor* (jabuticaba) foi detectada infestação por diferentes espécies de *Anastrepha* e *C. capitata*, enquanto as espécies de frutos introduzidos *S. malaccensis* (jambo vermelho) e *C. sinensis* (laranja Bahia) apresentaram infestação apenas por espécies de *Anastrepha* (Tabela 6).

Tabela 6 - Caracterização da distribuição geográfica, dos hospedeiros e das espécies de moscas-das-frutas coletadas nos estados da Bahia, Espírito Santo e São Paulo.

Locais de coleta	Área	Hospedeiro	N° de frutos	Peso	N° de pupas	N° de adultos	Espécie de mosca
Anagé- BA	Rural	<i>Armadilha</i>	-	-	-	6♀	6 <i>A.fraterculus</i>
Barreiras- BA	Rural	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	25	2,3	15	2♀	2 <i>A.zenilldae</i>
Camamu- BA	Rural	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	6	1,5	108	27♀ 12♂	17 <i>A.fraterculus</i> , 7 <i>A.sororcula</i> , 3 <i>A.zenilldae</i>
Eunapólis- BA	Rural	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	2	0,3	3	2♀	2 <i>A.fraterculus</i>
Gandu- BA	Rural	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	14	1,5	49	15♀ 11♂	13 <i>A. fraterculus</i> e 2 <i>A.sororcula</i>
		<i>E. uniflora</i> (Pitanga)	25	0,2	17	1♀ 2♂	1 <i>A.fraterculus</i>
Ibirataia- BA	Rural	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	50	2,8	60	18♀ 11♂	16 <i>A.fraterculus</i> , 1 <i>A.zenilldae</i> e 1 <i>A.sororcula</i>
Ilhéus- BA	Rural	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	14	1,7	32	17♀ 15♂	17 <i>A.fraterculus</i>
		<i>E. stipitata</i> (Araçá boi)	4	0,8	4	1♀	1 <i>A.fraterculus</i>
Ipiaú- BA	Rural	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	14	0,95	43	15♀ 14♂	12 <i>A.fraterculus</i> , 2 <i>A.sorocula</i>
Itaberaba- BA	Urbana	<i>P.guajava</i> (Goiaba)	57	4,6	85	36♀ 41♂	36 <i>C. capitata</i>
	Rural	<i>Armadilha</i>	-	-	-	6♀	6 <i>A.fraterculus</i>
Itabuna- BA	Urbana	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	12	1	93	18 ♀ 9 ♂	5 <i>A.fraterculus</i> e 13 <i>A. zenilldae</i>
Itacaré- BA	Rural	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	1	0,15	15	5♀ 8♂	5 <i>A.fraterculus</i>
Itapetinga- BA	Urbana	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	2	0,4	2	2♀	1 <i>A. fraterculus</i> e 1 <i>A. zenilldae</i>
Itapé -BA	Rural	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	34	2,85	350	160♀ 165♂	89 <i>A.fraterculus</i> , 13 <i>A.sororcula</i> , 58 <i>A.zenilldae</i>
Itiruçu- BA	Urbana	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	10	2,05	29	4♀ 10♂	4 <i>A. fraterculus</i>
Ituberá- BA	Rural	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	-	-	-	6♀	6 <i>A. fraterculus</i>
Jacobina- BA	Urbana	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	9	1	33	10♀ 11♂	10 <i>Ceratitis capitata</i>
		<i>P. guineense</i> (Araçá)	24	0,68	24	7♀ 4♂	7 <i>C. capitata</i>
Jitaúna- BA	Rural	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	95	7,3	90	16♀ 16♂	16 <i>A.fraterculus</i>
Juazeiro- BA	Rural	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	56	4,5	51	15♀ 20♂	7 <i>A.zenidae</i> e 8 <i>A.sororcula</i>
L. Paulista-SP	Rural	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	18	1,35	39	8♀ 4♂	7 <i>A.fraterculus</i> e 1 <i>A.obliqua</i>
Livramento -BA	Rural	<i>Armadilha</i>	-	-	-	10♀	10 <i>A.fraterculus</i>
Milagres- BA	Urbana	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	13	0,65	15	8♀ 7♂	8 <i>A.sororcula</i>

Nova Ibiá- BA	Rural	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	15	1,65	40	12♀ 15♂	12 <i>A.fraterculus</i>
		<i>S. malaccensis</i> (Jambo vermelho)	10	2,3	32	12♀ 10♂	12 <i>A.fraterculus</i>
Porto Seguro- BA	Rural	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	12	1,5	15	7♀ 7♂	7 <i>A.fraterculus</i>
		<i>C. sinensis</i> (Laranja)	7	2,3	52	25♀ 27♂	25 <i>A.fraterculus</i>
Taperoá- BA	Rural	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	4	1,2	45	12♀ 13♂	8 <i>A.fraterculus</i> , 3 <i>A.zenilidae</i> e 1 <i>A.sororcula</i>
Ubaíra- BA	Urbana	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	9	0,75	7	2♀ 1♂	1 <i>A.fraterculus</i> e 1 <i>A. zenilidae</i>
		<i>P. guajava</i> (Goiaba)	22	2,5	494	158♀ 164♂	150 <i>A. fraterculus</i> ; 5 <i>A.sororcula</i> ; 3 <i>A.zenilidae</i>
Una- BA	Rural	<i>E. uniflora</i> (Pitanga)	130	0,75	230	11♀ 08♂	11 <i>A.fraterculus</i>
		<i>P. guineense</i> (Araçá)	13	0,5	20	11♀ 04♂	11 <i>A.fraterculus</i>
		<i>S. malaccensis</i> (Jambo vermelho)	50	4,6	60	10♀ 9♂	6 <i>A.fraterculus</i> , 4 <i>A.zenidae</i>
		<i>P. guajava</i> (Goiaba)	10	1,6	20	4♀ 14♂	4 <i>A.fraterculus</i>
Valença- BA	Rural	<i>E. uniflora</i> (Pitanga)	64	0,5	17	1♀ 3♂	1 <i>A.fraterculus</i>
		<i>M.cauliflora</i> (Jabuticaba)	26	0	3	1♀ 2♂	1 <i>A.fraterculus</i>
S. M <sup>a</sup> da Vitória – BA	Rural	Armadilha	-	-	-	3♀	3 <i>A.fraterculus</i>
São Mateus- ES	Rural	<i>P. guineense</i> (Araçá)	17	0,5	42	15♀ 12♂	15 <i>A.fraterculus</i>
Wenceslau Guimarães- BA	Rural	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	6	0,4	23	7♀ 4♂	7 <i>A.fraterculus</i>

## 5.2. Extração e amplificação do gene ND6

Foi extraído o DNA total de dois a dez indivíduos de cada população amostrada, totalizando 221 indivíduos. As amostras submetidas à amplificação pela técnica da PCR resultaram em um fragmento de 740 pb, que compreende os genes mitocondriais: RNAt<sup>Pro</sup>, RNAt<sup>Tre</sup> e ND6 (Figura 3).

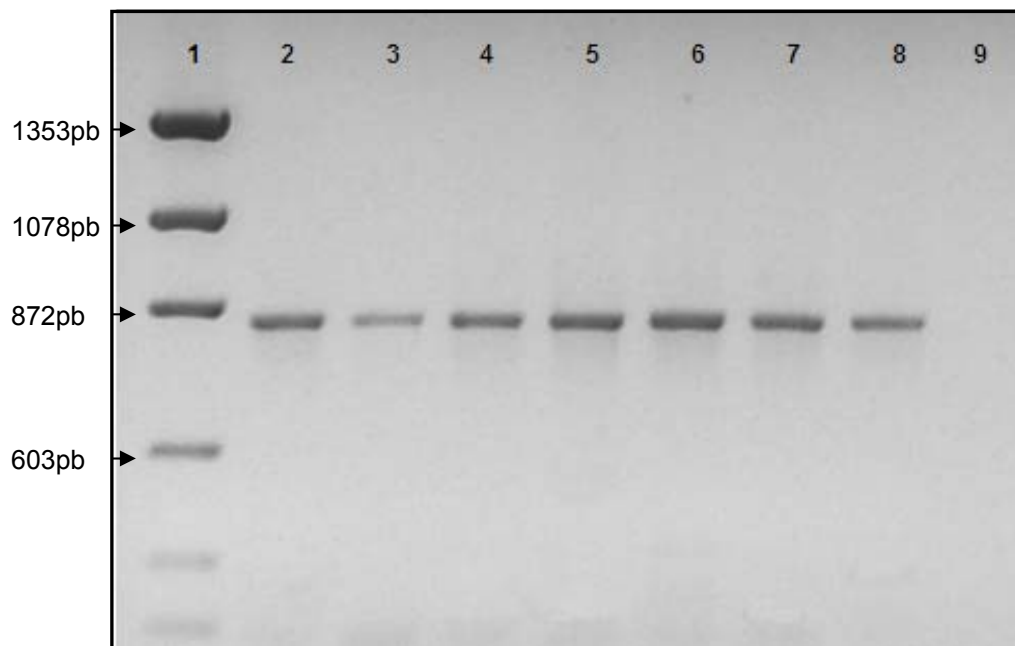


Figura 3- Amplificação do DNA gene ND6. Linha 1: Marcador de peso molecular  $\phi$ x174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*), linhas 2-8 indivíduos de Ipiaú (BA) e linha 9 controle negativo. Gel de agarose 1%.

### 5.3. PCR-RFLP - gene ND6

Na análise do gene ND6 por PCR-RFLP foram incluídas 29 populações de *A. fraterculus*, sendo que 27 foram de diferentes localidades do Estado da Bahia, uma população de São Paulo e uma população do Espírito Santo. O produto de PCR foi digerido por quatro endonucleases: *HaeIII*, *HphI*, *SspI* e *DraI*. Nenhum dos indivíduos analisados apresentou sítio de restrição para as enzimas *HaeIII* e *HphI*. A enzima *SspI* reconheceu três sítios de restrição em todos os indivíduos analisados de todas as populações estudadas, produzindo quatro fragmentos com os seguintes tamanhos: 80pb, 118pb, 156pb e 386pb (Figura 5). Não foi detectada variação intra ou interpopulacional nas amostras submetidas à digestão pela enzima *SspI*.

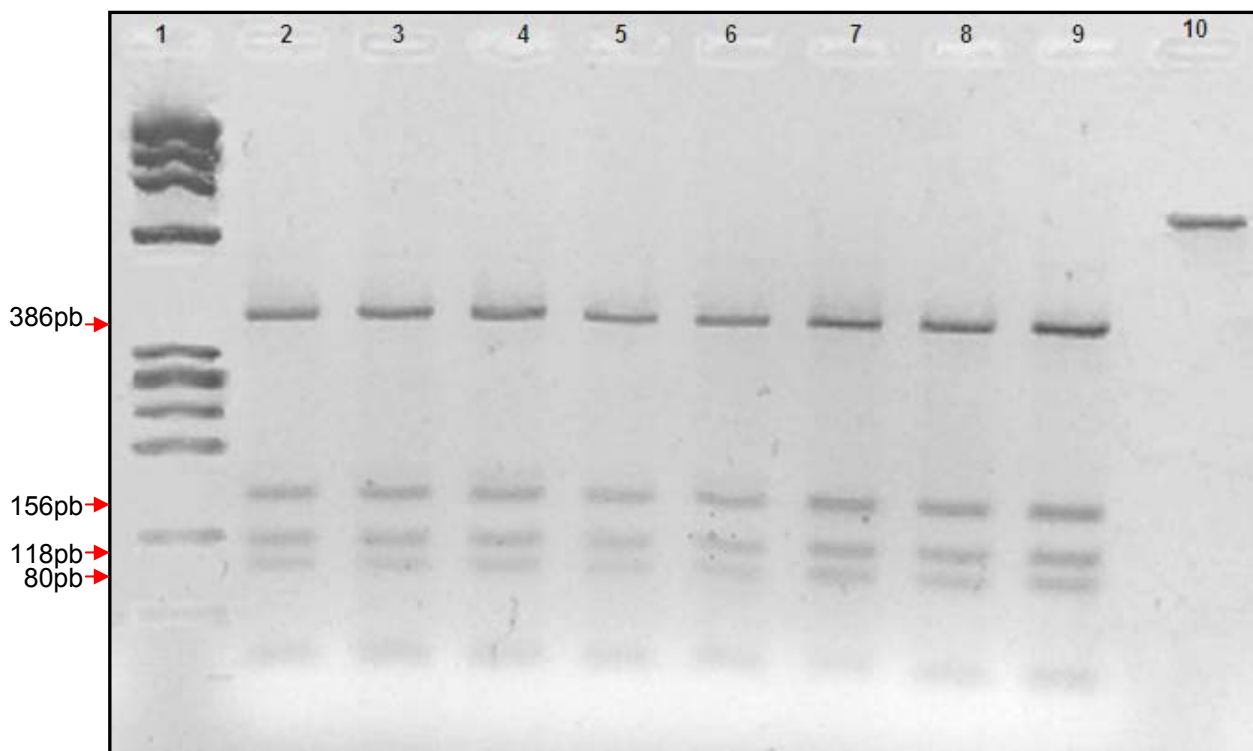


Figura 4- Padrão de restrição para o gene ND6 submetido à digestão pela enzima *SspI*. Linha 1: Marcador de peso molecular  $\phi$ x174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*), linhas 2-8: indivíduos de Laranjal Paulista (SP), linha 9: indivíduo de Ubaíra (BA), linha 10: produto de PCR não digerido. As setas vermelhas indicam os tamanhos dos fragmentos digeridos pela enzima *SspI*. Gel de agarose 2%.

A digestão pela enzima *DraI* evidenciou a existência de dois haplótipos distintos nos indivíduos de *A. fraterculus* estudados. O primeiro (padrão A) possui um sítio de reconhecimento e produz dois fragmentos de 281pb e 459pb (Figura 6A- linhas 2, 6 e 8), enquanto que o segundo (padrão B) não possui sítio de reconhecimento (Figura 6A- linhas 3, 4, 5 e 7) apresentando, portanto, um único fragmento de 740 pares de bases que corresponde ao produto de PCR. Não foi detectada variação nas populações da Bahia e Espírito Santo (padrão A), contudo foi observada variação intrapopulacional em Laranjal Paulista (SP) (padrões A e B) (Figura 6).

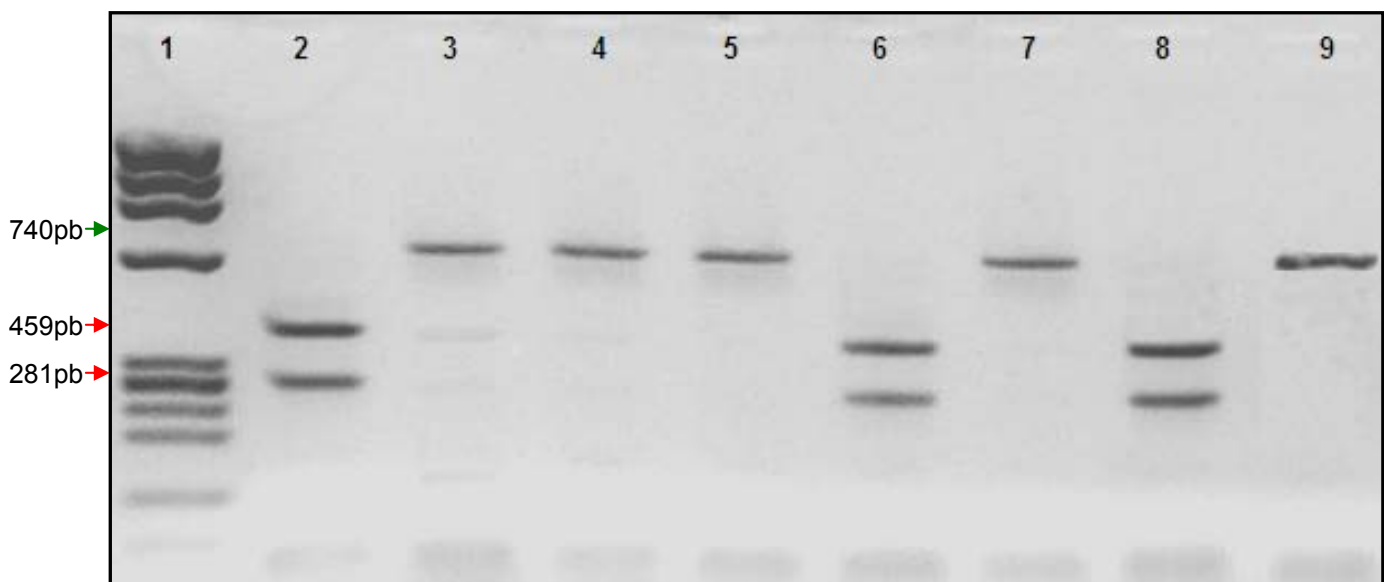


Figura 5 - Padrões de restrição para o gene ND6 submetido à digestão pela enzima *DraI*, exemplares de *A. fraterculus* da população que apresentou variação intrapopulacional. Linha 1: Marcador de peso molecular  $\phi$ x174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*), linhas 2-8: exemplares de Laranjal Paulista (SP), linha 9: produto de PCR não digerido. As setas vermelhas indicam os tamanhos dos fragmentos digeridos pela enzima *DraI*. A seta verde indica o fragmento não digerido. Gel de agarose 2%.

A presença de provável heteroplasmia foi detectada em dois indivíduos de Laranjal Paulista (SP) (Figura 6A-linhas 3 e 4) e em 13 indivíduos do Estado da Bahia, nas localidades de Itabuna (cinco indivíduos), Nova Ibiá (três indivíduos), Itacaré (três indivíduos) e Itiruçu (dois indivíduos) (Figura 7). O tamanho dos fragmentos foi estimado e está apresentado no Apêndice C.

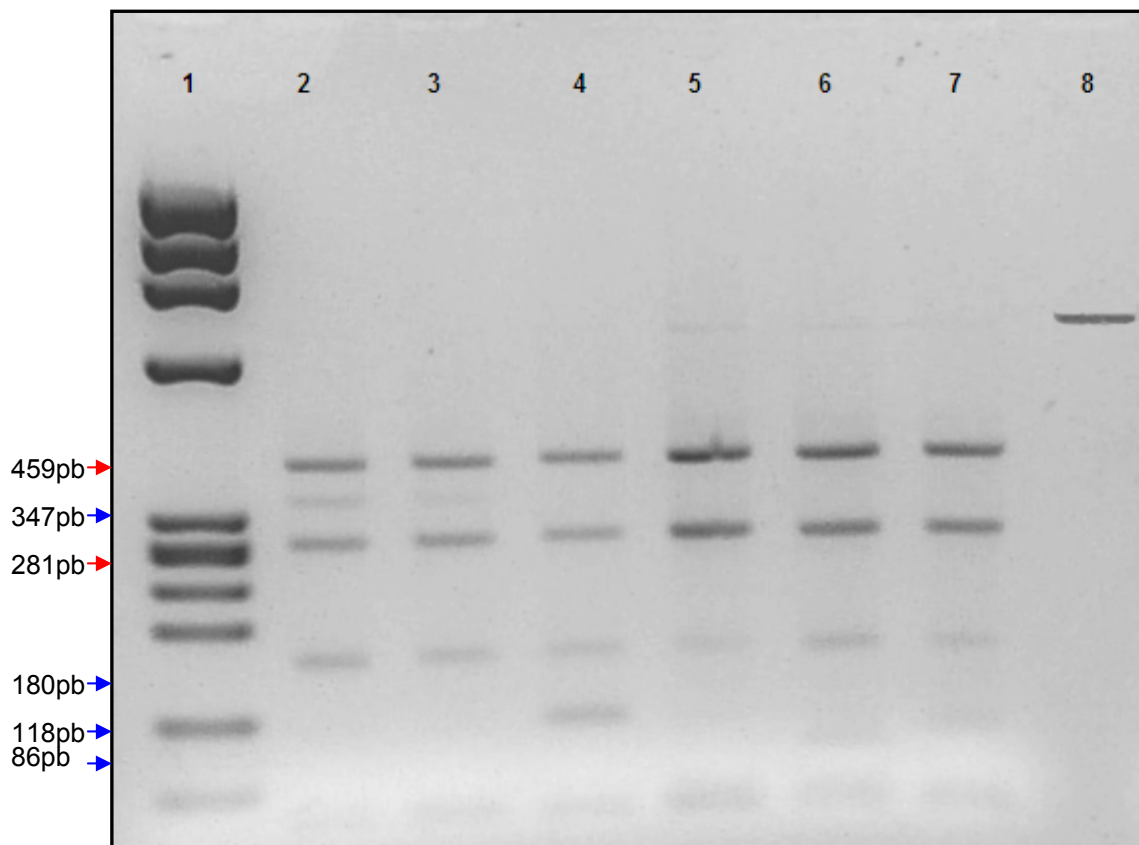


Figura 6- Padrões de restrição para o gene ND6 submetido à digestão pela enzima *DraI*, exemplares de *A. fraterculus* do Estado da Bahia. Linha 1: Marcador de peso molecular  $\phi$ x174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*), linhas 2-3: exemplares de Itabuna, linha 4: exemplar de Itacaré, linha 5: exemplar de Itiruçu, linhas 6-7: exemplares de Nova Ibiá, linha 8: produto de PCR não digerido. As setas vermelhas indicam os tamanhos dos fragmentos digeridos pela enzima *DraI*. As setas azuis indicam os fragmentos heteroplásmicos. Gel de agarose 2%.



#### 5.4. Sequenciamento do gene mitocondrial ND6

Foram obtidas 29 seqüências de um fragmento de 740 pb que compreende os gene RNAt<sup>Thr</sup>, RNAt<sup>Pro</sup> e ND6 de indivíduos da espécie *A. fraterculus*. Esta região corresponde às posições 9974-10586 do DNAmít de *Drosophila yakuba* (CLARY e WOLSTENHOLME, 1985). Um total de amostras de 14 localidades do Estado da Bahia, uma localidade do Espírito Santo e uma localidade de São Paulo (Tabela- 4) foram seqüenciadas. O comprimento do fragmento variou de 513 a 613 pares de bases. A composição média dos nucleotídeos foi 37,5% de timina, 16,5% de citosina, 38,4% de adenina e 7,6% de guanina.

Foi detectada a presença de 24 sítios variáveis gerando 17 haplótipos nas amostras de *A. fraterculus* analisadas (Tabela - 7). A diversidade nucleotídica encontrada foi de 0, 011.

Tabela 7- Haplótipos encontrados nas amostras de *A. fraterculus*.

Haplótipo	Localidade
1	Santa Maria da Vitória (BA)
2	Anagé (BA)
3	Ibirataia (BA)
4	Itacaré (BA) e Una (BA)
5	Porto Seguro (BA) e Itabuna (BA)
6	Ubaíra (BA)
7	Jitaúna (BA)
8	Laranjal Paulista (SP) e São Mateus (ES)
9	Laranjal Paulista (SP)
10	Itiruçu (BA) e São Mateus (ES)
11	Livramento de Nossa Senhora (BA)
12	Itabuna (BA)
13	Valença (BA), Taperoá (BA) e Camamu
14	Ituberá (BA)
15	Chapecó (SC)
16	Vacaria (RS)
17	Cananéia (SP), Campinas (SP), Janaúba (SP) e Linhares (ES)

A distância média de Jukes-Cantor entre as populações do grupo *fraterculus* foi de  $0,018 \pm 0,004$ , tendo o nível de divergência variado de 0 a 0,073. Para comparar a distância genética entre as amostras analisadas, uma

matriz foi gerada (Apêndice B), nesta matriz de distância as seqüências são comparadas par a par.

#### 5.4.1 Método de agrupamento de vizinhos (Neighbor-Joining)

Por meio do método de agrupamento de vizinhos utilizando a distância de Jukes-Cantor, foi obtida a árvore filogenética utilizando seqüências do gene ND6 (Figura 8). *A. serpentina*, utilizada como grupo externo, foi posicionada na base da árvore filogenética. As espécies do grupo *fraterculus*, *A. amita*, *A. fraterculus*, *A. obliqua*, *A. sororcula*, *A. turpiniae* e *A. zenildae* formaram um grupo monofilético.

As populações de *A. zenildae* formaram um grupo na base da árvore filogenética com um forte suporte estatístico na análise de *bootstrap* (100%). *A. turpiniae* foi posicionada separadamente do grupo monofilético formado por *A. fraterculus*, *A. obliqua*, *A. sororcula* e *A. amita*, com alto suporte (90%).

Dentro deste grande grupo, cinco subgrupos distintos foram formados alguns politípicos e outros monotípicos. O primeiro subgrupo (I) foi formado por amostras de *A. fraterculus* do Sul do Brasil, Chapecó (SC) e Vacaria (RS), com um forte suporte estatístico (100%), evidenciando uma divergência genética em relação às outras populações da espécie nominal *A. fraterculus*. O segundo subgrupo (II) foi formado por um único indivíduo de *A. fraterculus* da localidade de Ituberá (BA). O terceiro subgrupo (III) foi formado por *A. amita* e diferentes populações de *A. fraterculus* e *A. sororcula*. Diferentes populações de *A. obliqua* e uma amostra de *A. fraterculus* de Ubaíra (BA) formaram o quarto subgrupo (IV). O quinto subgrupo (V) reuniu diferentes populações de *A. fraterculus* da Bahia, uma população do Espírito Santo e uma população de São Paulo, além de uma amostra de *A. obliqua* e *A. sororcula* coletadas na Bahia. Tanto *A. sororcula* quanto *A. obliqua* do subgrupo V não se agruparam com as demais amostras das mesmas espécies de outras localidades.

Os resultados indicam que *A. obliqua*, *A. sororcula* e *A. fraterculus* não formam grupos monofiléticos.

Foram observadas diferenças genéticas intra e interpopulacionais em *A. fraterculus*. Indivíduos coletados em localidades próximas como, por exemplo, Ibirataia e Jitaúna (38 quilômetros de distância) exibiram uma distância genética mais alta ( $d:0,007$ ) do que indivíduos geograficamente distantes como São Paulo II e Itabuna que apresentaram distância genética nula. Porém, em alguns casos foi observada relação entre a distância geográfica e a distância genética, ou seja, maior distância genética entre populações geograficamente mais distantes como Laranjal Paulista e Itacaré (1.897 quilômetros),  $d: 0, 011$ .

Os dois indivíduos de *A. fraterculus* do sul do Brasil (Chapecó e Vacaria) quando comparados às outras populações de *A. fraterculus* de diferentes localidades do Brasil a distância encontrada varia entre 0,042 (Vacaria, RS e Jitaúna, BA) e 0,054 (Vacaria, RS e Itacaré, BA).

Na matriz de distância, a mais alta distância genética encontrada entre as populações de *A. fraterculus* presentes neste estudo e a espécie *A. sororcula* foi de 0,011. Portanto, a diferença genética exibida por alguns indivíduos de *A. fraterculus* de localidades diferentes é igual ou maior do que a diferença genética encontrada entre as duas espécies irmãs, *A. fraterculus* e *A. sororcula*. As amostras de *A. fraterculus* de diferentes hospedeiros de uma mesma localidade exibiram distância genética nula quando comparados entre si. Foi incluído nas análises mais de um indivíduo das localidades de São Mateus (ES) e Laranjal Paulista (SP) coletados no mesmo pomar e na mesma espécie de hospedeiro, araçá e goiaba respectivamente. Apesar disso, as amostras foram posicionadas em grupos distintos (grupo III e grupo V).

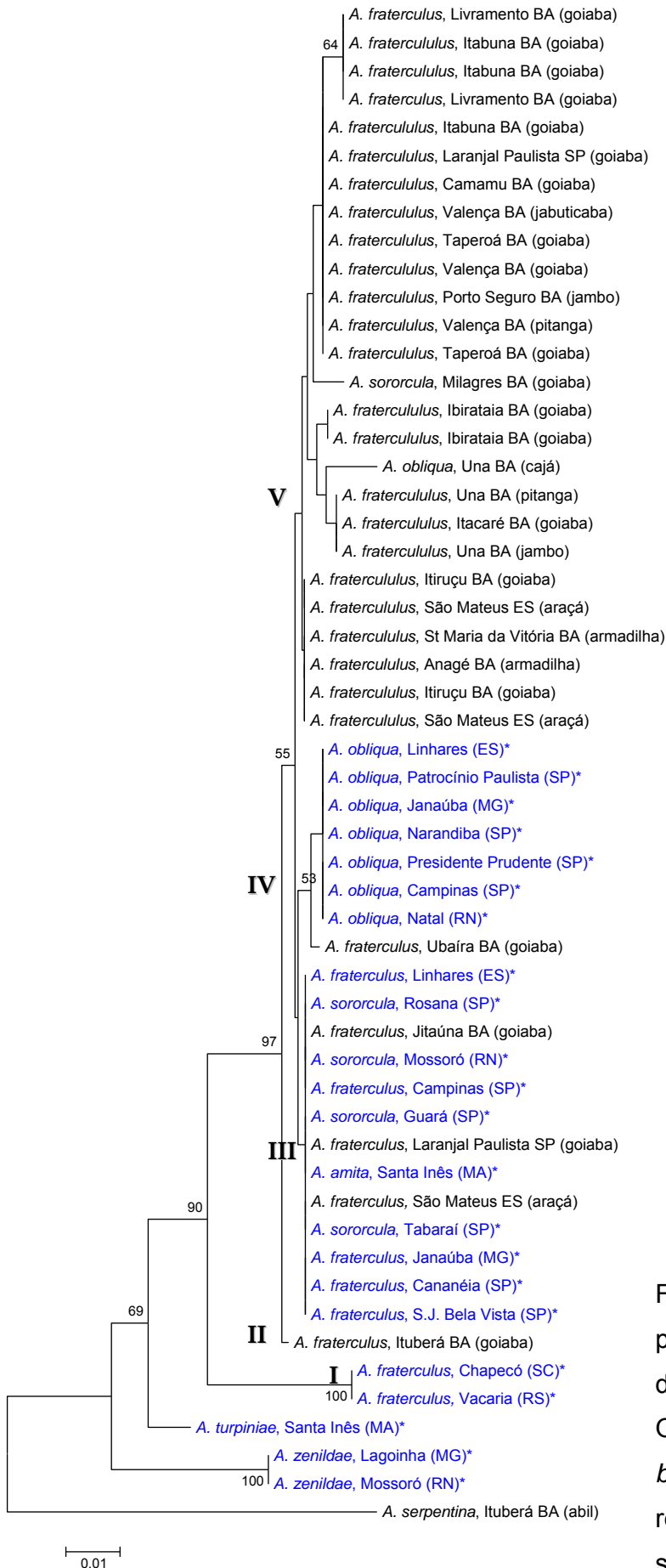


Figura 8 – Relações filogenéticas entre populações de *A. fraterculus* inferidas a partir da análise pelo método de Neighbor-Joining. Os números nos ramos indicam os valores de *bootstrap* superiores a 50% (1000 replicações). Em destaque, exemplares seqüenciados por Smith-Caldas (2001).

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Distribuição e relação com o hospedeiro dos espécimes coletados

No presente estudo foram identificadas as seguintes espécies de moscas-das-frutas: *A. fraterculus*, *A. obliqua*, *A. sororcula*, *A. zenildae* e *C. capitata*. No Recôncavo Baiano, representado neste trabalho pelas localidades de Camamu, Ituberá, Taperoá e Valença, foi verificada a presença de três espécies de *Anastrepha* infestando diferentes hospedeiros da família Myrtaceae, entre essas espécies a mais freqüente nas amostras coletadas foi *A. fraterculus* (72,54%). Nascimento e Zucchi (1981) realizaram um levantamento de espécies de moscas-das-frutas nessa região, utilizando armadilhas para coleta dos exemplares, verificaram que as espécies mais freqüentes são: *A. fraterculus*, *A. obliqua*, *A. sororcula*, *A. distincta* e *A. serpentina*. Nas localidades de Camamu e Taperoá foram identificados indivíduos da espécie *A. zenildae*, esta espécie ainda não tinha sido identificada nessa região até o referido momento.

No extremo sul e sul da Bahia, foram identificadas três espécies de *Anastrepha* infestando diferentes hospedeiros da família Myrtaceae e um hospedeiro da família Rutaceae. A espécie mais freqüente em todas as

amostras coletadas foi *A. fraterculus* (78,36%), corroborando com os dados de estudos realizados nesta região. Souza Filho (2005) verificou a existência de três espécies infestando goiaba *A. zenildae*, *A. sororcula* e *A. fraterculus* sendo a última espécie a mais freqüente (95,88%). Em coletas por meio de armadilhas McPhail, Bittencourt et al. (2006) e Dutra (2007) também registraram *A. fraterculus* como a espécie mais freqüente 77,4% e 72,9%, respectivamente.

Dois fatores podem explicar a alta freqüência de *A. fraterculus* nas regiões do recôncavo, sul e extremo sul. O primeiro diz respeito ao hospedeiro coletado, pois apesar de estar associada a diferentes famílias de plantas hospedeiras, *A. fraterculus* apresenta preferência pelos hospedeiros da família Myrtaceae (ZUCCHI, 2007; NASCIMENTO e CARVALHO, 2000a). O segundo é que estas regiões são caracterizadas por apresentar um clima úmido e *A. fraterculus* está mais adaptada a este tipo de ambiente (NASCIMENTO e CARVALHO, 2000b).

No sudoeste baiano, representado neste trabalho pelas localidades de Anagé, Ibirataia, Ipiaú, Itapetinga, Itiruçu, Jitaúna, Livramento de Nossa Senhora e Ubaíra, foram identificadas três espécies de *Anastrepha*: *A. fraterculus*, *A. zenildae* e *A. sororcula* coletadas de frutos (goiaba) e através de armadilha McPhail. Apesar de incluir poucas amostras, esse é o primeiro relato de identificação de espécies de moscas-das-frutas nessa região, com exceção do município de Livramento de Nossa Senhora. Nascimento e Carvalho (2000b) destacam que nessa localidade há um predomínio de *C. capitata* (99.39%), devido ao cultivo de manga (*Mangifera indica*) e ao clima ameno desta região.

O norte do Estado da Bahia foi representado neste trabalho pelas localidades de Juazeiro e Jacobina, o centro sul por Itaberaba e Milagres e o oeste pelas localidades de Barreiras e Santa Maria da Vitória. Essas regiões ficam localizadas no semi-árido baiano, caracterizado pela baixa pluviosidade (GIULIETTI et al., 2006). Nos frutos de goiaba coletados em áreas agrícolas foram identificadas as espécies: *A. sororcula* e *A. zenildae* e em áreas urbanas *C. capitata*. Nascimento e Carvalho (2000b) relatam que na região de

Juazeiro/Petrolina as espécies que apresentam maior freqüência são: *A. obliqua*, *A. pickeli*, *A. dissimilis* e *A. sororcula* em áreas agrícolas e *C. capitata* em zona urbana corroborando os resultados obtidos neste trabalho, apesar de Nascimento e Carvalho (2000b) não citarem a presença de *A. zenildae* em Juazeiro sabe-se que esta espécie ocorre na região de Petrolina (PE) (HAJI e MIRANDA, 2000). Outros estudos mostraram que em frutos de goiaba nas regiões do semi-árido as espécies *A. zenildae* e *A. sororcula* são encontradas em maior freqüência, tudo indica que estas espécies estão mais adaptadas ao clima destas regiões (CANAL et al., 1998; ARAÚJO e ZUCCHI, 2003)

Na localidade de São Mateus, norte do Espírito Santo, foi observada a presença de *A. fraterculus* infestando araçá. Em áreas remanescentes de Mata Atlântica, isto também foi observado por Uramoto (2007). De acordo com Martins et al. (2000) e Uramoto (2007), neste Estado as espécies mais freqüentes de moscas-das-frutas são: *C. capitata* e *A. fraterculus*.

Na localidade de Laranjal Paulista (SP), apesar do pequeno número de amostras coletadas (18 frutos de goiaba), foi observada a presença de duas espécies: *A. fraterculus* e *A. obliqua*. Souza-Filho et al. (2000) relataram que são conhecidas sete espécies que infestam goiabas no Estado de São Paulo entre elas as mais freqüentes são: *A. fraterculus*, *A. obliqua*, *A. sororcula*, *A. pseudoparallela* e *C. capitata*.

De acordo com Malavasi et al. (1980) e Ovruski et al. (2003), *C. capitata* tem preferência por hospedeiros introduzidos enquanto as espécies de *Anastrepha* infestam frutos nativos, mas o primeiro autor destaca que já existe uma adaptação de *C. capitata* a frutos nativos e das espécies de *Anastrepha* a frutos introduzidos, isto foi observado nos resultados deste estudo. As espécies de frutos nativos *P. guineense* e *P. guajava* foram infestadas por *C. capitata* e as espécies de frutos introduzidos *S. malaccensis* e *C. sinensis* foram infestadas por espécies de *Anastrepha*.

## 6.2. PCR-RFLP gene ND6

Os resultados da técnica de PCR-RFLP utilizando a enzima *DraI*, revelaram variação intrapopulacional nas amostras de Laranjal Paulista (SP), onde dois padrões foram registrados. Smith-Caldas (2001) utilizando a mesma técnica também encontrou variação em indivíduos de populações de diferentes localidades do Estado de São Paulo. Em populações de Campinas, Valinhos e Vinhedo foi observada variação intrapopulacional com a presença de dois haplótipos ocorrendo simultaneamente. Santos (1999) analisando o gene nuclear DNAr, através de quatro enzimas de restrição, diferenciou as populações de *A. sp1 aff. fraterculus* e *A. sp.2 aff. fraterculus* de diferentes localidades do Estado de São Paulo.

Apesar de não examinar as mesmas regiões do genoma, estes estudos apontam que no Estado de São Paulo existe variabilidade intrapopulacional na espécie *A. fraterculus*. Atualmente, de acordo com dados morfológicos, genéticos e de cruzamento, são reconhecidas três espécies dentro do complexo *A. fraterculus* neste Estado (SELIVON e PERONDINI, 1998; SELIVON et al., 2004; SELIVON et al., 2005; GODAY et al., 2006).

Nas diferentes localidades do Estado da Bahia e São Mateus (ES) examinadas neste estudo, apenas o padrão A foi identificado. Na análise da região intergênica entre os genes tRNA<sup>Leu</sup> e o gene COII através da enzima *PsiI*, as populações de Linhares (ES) e Cruz das Almas (BA), apresentaram o mesmo haplótipo (SMITH-CALDAS, 2001). Contudo, não se pode afirmar que as populações presentes nestes Estados são similares, estudos futuros com um maior número de amostras de diferentes localidades do Espírito Santo e com um maior número de enzimas de restrição, analisando diferentes regiões do DNA mitocondrial podem elucidar esta questão.

A presença de provável heteroplasmia foi detectada em indivíduos de diferentes localidades da Bahia e de Laranjal Paulista (SP). A heteroplasmia pode decorrer da mutação no genoma de uma ou mais mitocôndrias, gerando uma mistura de mitocôndrias mutantes e normais, este fenômeno já foi observado em diferentes espécies de insetos como: *Aedes aegypti* Linnaeu



(PADUAN e RIBOLLA, 2008), *Drosophila melanogaster* Meigen (KANN et al., 1997). *Drosophila subobscura* Collin (MOREL et al., 2006) e *Thrips tabaci* Lideman (FREY e FREY, 2004).

Sete padrões foram observados (Apêndice - 3) nos indivíduos que apresentaram heteroplasmia para a enzima *Dral*. Para certificar que estes padrões não foram causados por digestões parciais ou uma possível contaminação, as amostras foram submetidas a novas digestões com uma concentração maior da enzima e os padrões continuaram sendo observados.

Existem duas explicações para a ocorrência de heteroplasmias. A primeira diz que a fase de heteroplasmia é transiente a fase de homoplasia durante a evolução do DNAmít, isto é, uma mutação pode introduzir uma variação em uma população e os mutantes podem se replicar em diferentes razões. A frequência das moléculas de DNAmít mutantes dentro da célula poderá ser objeto da deriva genética. Durante a mitose e citocinese, organelas ou células que possuem alto valor adaptativo poderão transmitir essa característica para a sua descendência e assim esta mutação pode se fixar resultando na distinção genética dessa população (RAND, 2001).

A segunda explicação é a presença de híbridos. Em algumas espécies de animais, as mitocôndrias paternas são eliminadas após o processo de fecundação por proteínas específicas do ovócito. Em híbridos, a especificidade no processo de reconhecimento pode ser ineficaz (ROKAS et al., 2003). Esse fato foi observado em indivíduos resultantes de cruzamentos entre as espécies *D. simulans* e *D. mauritiana* (KONDO et al., 1990). Santos (1999) em condições laboratoriais obteve híbridos entre as espécies: *A. fraterculus*, *A. sororcula* e *A. obliqua*, sendo que a maioria dos híbridos da F<sub>1</sub> era fértil, podendo se retrocruzar com as espécies parentais. Em populações naturais, estas espécies possuem diferenças no horário de cópula e sons de chamada dos machos, mas a autora destaca que estes mecanismos de isolamento podem ser rompidos na condição de não haver possibilidade de escolha de um parceiro.

### 6.3. Sequenciamento do gene mitocondrial ND6

A espécie *A. serpentina* ficou posicionada na base da árvore filogenética, esta espécie pertence ao grupo *serpentina* e foi utilizada neste estudo como grupo externo.

As espécies pertencentes ao grupo *fraterculus*: *A. amita*, *A. fraterculus*, *A. obliqua*, *A. sororcula*, *A. turpiniae* e *A. zenildae* formaram um grupo monofilético. De acordo com Norrbom et al. (2000) as características morfológicas de 29 espécies do grupo *fraterculus* apontam para a monofilia do grupo. Nas análises filogenéticas realizadas com os genes COI, 16S RNAr e *period* incluindo um número maior de espécies do que o presente estudo, este grupo é monofilético com a exclusão de *A. barbiellinii*. Cabe ressaltar que *A. barbiellinii* foi incluída no grupo *fraterculus* com base apenas em análises morfológicas, contudo, esta espécie mostra-se distante geneticamente de outras espécies do grupo *fraterculus* (McPHERON et al., 1999; SMITH-CALDAS et al., 2001; BARR et al., 2005).

As duas populações de *A. zenildae* formaram um agrupamento único com um forte suporte estatístico. Esta espécie tem como hospedeiro preferencial espécies de plantas da família Myrtaceae (ZUCCHI, 2000b) e apresenta semelhanças morfológicas com as espécies *A. fraterculus*, *A. obliqua* e *A. sororcula* distinguindo-se destas apenas por características sutis do ápice do acúleo (ARAÚJO et al., 1998, ARAÚJO e ZUCCHI 2006). Na análise com o gene COI *A. zenildae* é agrupada com amostras de *A. fraterculus* de Caracas, Venezuela com forte suporte estatístico (94%), evidenciando a proximidade entre estas duas espécies (SMITH-CALDAS et al., 2001).

*A. turpiniae* foi posicionada separadamente do grupo monofilético formado por *A. fraterculus*, *A. obliqua*, *A. sorocula* e *A. amita*. Nas análises com o gene COI, foi verificado que esta espécie agrupou-se com amostras de *A. amita* (SMITH-CALDAS et al., 2001).

As populações de *A. fraterculus* de Chapecó (SC) e Vacaria (RS) formaram um agrupamento único neste estudo. A distância genética entre essas populações e populações de outras localidades foi alta em nível de

espécies distintas (variando entre 0.042, Vacaria, RS e Jitaúna, BA e 0.054, Vacaria, RS e Itacaré, BA). Os dados de sequenciamento de DNA, isoenzimas e citogenéticos indicam que as populações de *A. fraterculus* da Argentina e do sul do Brasil formam uma espécie única (SMITH-CALDAS et al., 2001; ALBERTI et al., 2002; BASSO et al., 2003; ALBERTI et al., 2007). Smith-Caldas et al. (2001) comparam as populações dessa região com outras populações de diferentes localidades do Estado de São Paulo e Santo Amaro (BA) utilizando seqüências do gene mitocondrial COI. Nessa análise, as populações do sul do Brasil formam um grupo distinto das populações dessas localidades com um forte suporte estatístico, corroborando os resultados obtidos nesse trabalho.

A amostra de Ituberá (BA) ficou em um ramo separado de todos os indivíduos analisados. De acordo com as distâncias genéticas calculadas e comparadas com as amostras de diferentes localidades de *A. fraterculus*, este indivíduo apresenta-se geneticamente divergente das demais populações, contudo, é necessária a inclusão de novas amostras dessa localidade e o uso de outros caracteres morfológicos para caracterizar melhor esta divergência.

As populações de *A. fraterculus* de diferentes localidades do Estado de São Paulo, Espírito Santo e uma localidade da Bahia, ficaram agrupadas com diferentes populações de *A. sororcula* e um indivíduo de *A. amita*, formando o terceiro grupo. *A. fraterculus* e *A. sororcula* apresentam-se como espécies próximas, condizente com as análises morfológicas, cariotípicas, isoenzimáticas e moleculares (McPHERON et al., 1999; SMITH-CALDAS et al., 2001; SELIVON et al., 2005).

Selivon et al. (2005) observaram que as populações de *A. fraterculus* de algumas localidades como, por exemplo, Bauru (SP), Louveira (SP), Santa Isabel (SP) e Sete lagoas (MG) mostravam-se mais relacionadas à *A. sororcula* do que a outras populações de *A. fraterculus* como, por exemplo, Conceição do Almeida (BA), Natal (RN) e São Sebastião (SP). Smith-Caldas et al. (2001) fizeram a mesma observação, porém com amostras de diferentes localidades. Portanto, nas análises do gene ND6, a espécie *A. fraterculus* não forma um grupo monofilético, assim como foi observado em outras análises genéticas.

A amostra de *A. sororcula* de Milagres (BA) mostrou-se divergente das outras populações de *A. sororcula*, contudo, o suporte estatístico foi baixo. Smith-Caldas et al. (2001) analisaram dois indivíduos desta espécie e na árvore de máxima parcimônia, estas não aparecem no mesmo clado. Estudos com outros genes ou outros marcadores moleculares, assim como a inclusão de um maior número de amostras poderá esclarecer melhor a história evolutiva de *A. sororcula*.

As amostras de *A. obliqua* de diferentes localidades do Brasil formaram um agrupamento único, com exceção da amostra de Una (BA). Smith-Caldas et al. (2001) baseados na análise filogenética usando seqüências do gene COI, indicaram que a espécie *A. obliqua* pode ser um complexo de espécies crípticas. Este estudo foi o primeiro a indicar tal fato, posteriormente corroborado pelo estudo de Boykin et al. (2006) que incluíram amostras adicionais de *A. obliqua* do Caribe (Jamaica e Porto Rico).

Com relação à espécie *A. fraterculus*, os resultados indicam similaridade genética entre populações geograficamente distantes (São Mateus, ES e Santa Maria da Vitória, BA), enquanto alguns indivíduos coletados na mesma localidade e infestando o mesmo hospedeiro exibem uma distância genética alta (Laranjal Paulista, SP). Morgante et al. (1980) encontraram resultados semelhantes, isto é, similaridade genética entre populações geograficamente distantes (São Paulo, SP e Recife, PE) e populações simpátricas coletadas em diferentes hospedeiros exibindo alto grau de divergência genética. Selivon et al. (2005) também relatam similaridade genética entre populações distantes como nas populações de Conceição do Almeida (BA) e Santa Isabel (SP) e populações simpátricas apresentando distinção genética (Santa Isabel).

As amostras de *A. fraterculus* da localidade de Laranjal Paulista (SP) foram incluídas em dois grupos distintos, no terceiro grupo juntamente com amostras de diferentes localidades do Estado de São Paulo, São Mateus (ES) e Jitaúna (BA) e no quinto grupo juntamente com amostras de diferentes localidades da Bahia. O indivíduo que ficou agrupado com as amostras da Bahia exibiu o mesmo padrão enzimático observado pela técnica de PCR/RFLP. Conforme Selivon et al. (2005), as amostras de diferentes

localidades de São Paulo formam dois grupos, no primeiro encontra-se populações de São Paulo e Sul do Brasil e no segundo amostras de São Paulo, Natal e Conceição do Almeida (BA) – Recôncavo Baiano. Atualmente, são reconhecidas três espécies dentro do complexo *A. fraterculus* no Estado de São Paulo, de acordo com dados morfológicos, genéticos e de cruzamento (SELIVON e PERONDINI, 1998; SELIVON et al., 2004; SELIVON et al., 2005; GODAY et al., 2006).

Não foram verificadas distâncias genéticas altas entre indivíduos da mesma localidade que infestavam diferentes hospedeiros. Malavasi e Morgante (1983) estudando oito hospedeiros diferentes infestados por *A. fraterculus* demonstraram não haver diferenciação genética entre esses indivíduos. A distinção genética devido ao tipo de hospedeiro infestado foi verificado no complexo *R. pomonella*, espécies univoltinas de moscas-das-frutas. As populações ancestrais deste grupo infestam o hospedeiro *Crataegus* spp. Quando a maçã foi introduzida no norte dos Estados Unidos (século IXX), foi observado que as populações de *R. pomonella* que infestavam este hospedeiro exibiam características biológicas diferentes. O rápido processo de especiação verificado nesse grupo foi devido a inversões cromossômicas (BIERBAUM e BUSH, 1990; SELIVON, 2000; ALUJA e MANGAN, 2008). Boykin et al. (2006) analisando 12 populações de *A. suspensa* coletadas em diferentes hospedeiros, verificaram que estas populações formavam um grupo monofilético quando comparadas a diferentes espécies do grupo *fraterculus*, isto é, não foi encontrado um complexo de espécies crípticas como observado em *A. fraterculus* e *R. pomonella*. Devido às características biológicas encontradas nas espécies *A. fraterculus* e *A. suspensa* como a ausência de diapausa, a polifagia, o alto potencial reprodutivo e a falta de sincronização entre a emergência dos adultos e a frutificação do hospedeiro, parece pouco provável a diferenciação genética devido à mudança de hospedeiro para estas espécies (SELIVON, 2000; BOYKIN et al., 2006, ALUJA e MANGAN, 2008).

As distâncias genéticas entre alguns indivíduos de *A. fraterculus* de diferentes localidades foi igual ou maior do que a diferença genética encontrada entre *A. fraterculus* e *A. sororcula*. Selivon et al. (2005) também encontraram distâncias

genéticas altas entre diferentes populações de *A. fraterculus*. Por exemplo, a distância genética de Rogers entre as populações de Bauru (SP) e Natal (RN) foi de 0,439, entretanto, quando a primeira população foi comparada à *A. sororcula* de Conceição do Almeida (BA), foi observada uma distância genética mais baixa de 0,145. Morgante et al. (1980) também observaram distâncias genéticas altas entre diferentes populações e entre indivíduos da mesma população de *A. fraterculus*. Portanto, de acordo com estes estudos, indivíduos de *A. fraterculus* podem exibir distâncias genéticas inter e intrapopulacional altas em nível de espécies distintas.

Os dados apresentados neste trabalho fornecem informações adicionais sobre a heterogeneidade genética na espécie *A. fraterculus*, principalmente no Estado da Bahia. De acordo com o conceito filogenético, a espécie é o menor agrupamento diagnosticável de organismos individuais, dentro do qual há um padrão de ancestralidade e descendência (CRACAFT, 1989). Este estudo demonstrou que as populações de *A. fraterculus* do Estado da Bahia não formam um agrupamento único, tratando-se provavelmente de um complexo de espécies crípticas. Contudo, estudos com outros genes mitocondriais e nucleares, dados morfológicos, biológicos e citogenéticos com um maior número de amostras dessa região, podem fornecer mais informações sobre a espécie nominal *A. fraterculus*.

## 7. CONCLUSÕES

- ⇒ Foram identificadas as seguintes espécies de moscas-das-frutas: *A. fraterculus*, *A. obliqua*, *A. sororcula*, *A. zenildae* e *C. capitata* nos hospedeiros coletados das famílias Myrtaceae e Rutaceae.
- ⇒ Em frutos de goiaba coletados no Estado da Bahia, houve uma maior frequência da espécie *A. fraterculus* em regiões de clima úmido e de *A. sororcula* e *A. zenildae* na região do semi-árido.
- ⇒ Pela análise de PCR/RFLP com a enzima *DraI* existe variação intrapopulacional (exemplares de Laranjal Paulista) e interpopulacional (exemplares de Laranjal Paulista x Bahia e Espírito Santo) na espécie *A. fraterculus*.
- ⇒ A presença de provável heteroplasmia em *A. fraterculus* foi identificada em indivíduos das localidades de Itabuna (BA), Itacaré (BA), Itiruçu (BA), Laranjal Paulista (SP) e Nova Ibiá (BA).

- ⇒ A reconstrução filogenética inferida a partir do sequenciamento do gene ND6 revelou que a espécie nominal *A. fraterculus* não é monofilética, tratando-se de um complexo de espécies crípticas.
- ⇒ As populações da Bahia das espécies *A. obliqua* e *A. sororcula* podem ser geneticamente distintas de outras populações brasileiras.
- ⇒ O grupo *fraterculus* mostrou-se monofilético, porém a espécie *A. barbiellini* não foi incluída neste estudo.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTI, A. C.; CONFALONIERI, V. A.; ZANDOMENI, R. O.; VILARDI, J. C. Phylogeographic studies on natural populations of the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Genetica**, v. 132, n. 1, p. 1-8, 2007.

ALBERTI, A.C.; RODRIGUERO, MS; CENDRA, PG; SAIDMAN, BO; VILARDI, JC. Evidence indicating that Argentine populations of *Anastrepha fraterculus* belong to a single biological species. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 95,n. 4, p. 505-512, 2002.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 1462 p.

ALUJA , M. Bionomics and management of *Anastrepha*. **Annual Review of Entomology**, v.39, p.155-178, 1994.

ALUJA, M.; MANGAN, R. L. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) host status determination: critical conceptual, methodological, and regulatory considerations. **Annual Review of Entomology**, v. 53, p. 473-502, 2008.

ARAUJO, E. L.; ZUCCHI, R. A. Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) em goiaba (*Psidium guava* L.), em Mossoró, RN. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 1, p. 73-75, 2003.

ARAUJO, E. L.; NASCIMENTO, F. M.; ZUCCHI, R. A. Utilização da análise discriminante em estudos taxonômicos de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* Schiner, 1968 (Diptera: Tephritidae). **Scientia Agrícola**, v. 55, n. 1, 1998.

ARAUJO, E. L.; ZUCCHI, R. A. Medidas do acúleo na caracterização de cinco espécies de *Anastrepha* do grupo *fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 3, p.329-337, 2006.

ARIAS, M. C.; INFANTE-MALACHIAS, M. H. RFLP: o emprego de enzimas de restrição para a detecção de polimorfismos de DNA. In: Matioli, S.R. (ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto, São Paulo: Holos editora, p. 143-152, 2001.

AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history, and evolution**. 2ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2004, 684p.

BARR, N. B.; COPELAND, R. S.; MEYER, M.; MASIGA, D.; KIBOGO, H. G.; BILLAH, M. K.; OSIR, E.; WHARTON, R. A.; McPHERON, B. A. Molecular diagnostics of economically important *Ceratitis* fruit fly species (Diptera:Tephritidae) in África using PCR and RFLP analyses. **Bulletin of Entomological Research**, v. 96, n. 5, p. 505-521, 2006.

BARR, N. B.; LIWANG, C.; McPHERON, B. A. Molecular Systematics of nuclear gene *period* in genus *Anastrepha* (Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 98, n. 2, p. 173-180, 2005.

BARROS, M. D.; NOVAES, M.; MALAVASI, A. Estudos do comportamento de *Anastrepha fraterculus* (Wiedmann, 1830) (Diptera, Tephritidae) em condições naturais e de laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 12, n. 2, p. 243-247, 1983.

BASSO, A.; SONVICO, A.; QUESADA-ALLUE, L. A; MANSO, F. Karyotypic and molecular identification of laboratory stocks of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wied)(Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 96, n. 4, p.1237-1244, 2003.

BERLOCHER, S. H. Insect molecular systematics. **Annual Review of Entomology**, v. 29, p. 403-433, 1984.

BICKFORD, D.; LOHMAN, D. J.; SODHI, N. S.; SODJI, P. K. L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K. K.; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in ecology and evolution**, v. 22, n. 3, p.148-155, 2007.

BIERBAUM, T. J.; BUSH, G. L. Genetic differentiation in the viability of sibling species of *Rhagoletis* fruit flies on host plants, and the influence of reduced hybrid viability on reproductive isolation. **Entomologia Experimentais et Applicata**, v. 55, n. 2, 1990.

BIRKY Jr., C.W. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms and models. **Annual Review of Genetics**, v. 35, p. 125-148, 2001.

BITTENCORT, M. A. L.; COVA, A. K. W.; SILVA, A. C. M.; SILVA, V. E. S.; BONFIM, Z. V.; ARAÚJO, E. L.; SOUZA-FILHO, M. F. Espécies de moscas-das-frutas (Tephritidae) obtidas em armadilhas McPhail no Estado da Bahia, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, p.561-564, 2006.

BLOUÍN, M. S. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 5, p.527-531, 2002.

BORTEL, V. W.; TRUNG, H. D.; ROELANTS, P.; HARBACH, R. E.; BACKELJAU, T.; COOSEMANS, M. Molecular identification of *Anopheles minimus* s.l. beyond distinguishing the members of the species complex. **Insect Molecular Biology**, v. 9, n. 3, p. 335-340, 2000.

BOYKIN, L. M.; SHATTERS, JR.; HALL, D. G.; BURNS, R. E.; FRANQUI, R. A. Analysis of host preference and geographical distribution of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) using phylogenetic analyses of mitochondrial cytochrome oxidase I DNA sequence data. **Bulletin of Entomological Research**, v. 96, n. 5 p. 457-469, 2006.

BUSH, G. L. The cytotaxonomy of the larvae of some Mexican fruit flies in the genus *Anastrepha* (Tephritidae, Diptera). **Psyche**, v. 69, n. 3, p.87-101, 1962.

BUSH, G. L.; SMITH, J. J. The sympatric origin of phytophagous insects. **Ecological Studies**, v. 130, 1997.

CALCAGNOTTO, D. Taxas de evolução e relógio molecular. In: Matioli, S. R. (ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto, São Paulo: Holos Editora. p. 64-69, 2001.

CANAL, N. A.; ALVARENGA, C. D.; ZUCCHI, R. A. Níveis de infestação de goiaba por *Anastrepha zenildae* Zucchi (Diptera: Tephritidae), em pomares comerciais do norte de Minas Gerais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, n. 4, p. 657-661, 1998.

CARVALHO, R. S. Metodologia para Monitoramento Populacional de Moscas-das-Frutas em Pomares Comerciais. **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, circular técnica. Cruz das Almas-Bahia, 2005.

CLARKE, A. R.; ARMSTRONG, K. F.; CARMICHAEL, A. E.; MILNE, J. R.; RAGHU, S.; RODERICK, G. K.; YEATES, D. K. Invasive phytophagous pests arising through a recent tropical evolutionary radiation: the *Bactrocera dorsalis* complex fruit flies. **Annual Review of Entomology**, n. 50, p. 293-319, 2005.

CLARY, D. O.; WOLSTENHOLME, D. R. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization and genetic code. **Journal of Molecular Evolution**, n. 22, p. 252-271, 1985.

CRACRAFT, J. Molecules and morphology in evolution: conflict or compromise? **Cladistics**. v. 5, p.202-211, 1989.

della TORRE, A.; FANELLO, C.; AKOGBETO, M.; DOSSOU-YOVO, J.; FAVIA, G.; PETRARCA, V.; COLUZZI, M. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. **Insect Molecular Biology**, v. 10, n. 1, p. 9-18, 2001.

della TORRE, A.; ZHIJIAN, T.; PETRARCA, V. On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* s.s. molecular forms. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, p. 755-769, 2005.

DIÁZ-FLEISCHER, F.; ALUJA, M. Behavior of Tephritid flies: A historical perspective. In: Aluja, M. and A.L. Norrbom (eds). **Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior**: CRC Press, p. 343-361, 2000.

DOWLING, T. E.; MORITZ, C.; PALMER, J. D.; RIESEBERG, L. H. Nucleic acids III: analysis of fragments and restriction sites. In: HILLIS, D.M; MORITZ, B.K.Mable (eds.), **Molecular Systematics**. Sunderland, MA: Sinauer, p. 249-320, 1996.

DUTRA, V. S. **Fenologia reprodutiva de *Anastrepha fraterculus* (Wiedmann, 1830) e *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835) (Diptera: Tephritidae) em um pomar de goiaba em Una, Bahia**, 72p. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 2007.

FAIRLEY, T. L.; PÓVOA, M. M.; CONN, J. E. Evaluation of the Amazon River delta as a barrier to gene flow for the regional malaria vector, *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) in northeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 861-869, 2002.

FAVIA, G.; della TORRE, A.; BAGAYOKO, M.; LANFRANCOTTI, A.; SAGNON, N. F.; TOURÉ, Y. T.; COLUZZI, M. Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. **Insect Molecular Biology**, v. 6, n. 4, p.377-383, 1997.

FEDER, J. L.; BERLOCHER, S. H.; ROETHELE, J. B.; DAMBROSKI, H.; SMITH, J. J.; PERRY, W. L.; GAVRILOVIC, V.; FILCHAK, K. E.; RULL, J.; ALUJA, M. Allopatric genetic origins for sympatric host-plant shifts and race formation in *Rhagoletis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 18, 2003.

FREY, J. E.; FREY, B. Origin of intra-individual variation in PCR-amplified mitochondrial cytochrome oxidase I of *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae): mitochondrial heteroplasmy or nuclear integration? **Hereditas**, v. 140, n. 2, p.92-98, 2004.

FUTUYMA, D. J. **Evolution**. Sunderland: Sinauer Associates Inc. 543 p., 2005.

GASPARICH, G. E.; SILVA, J. G.; HAN, H-Y.; McPHERON, B. A.; STECK, G. J.; SHEPPARD, W. S. Population genetic structure of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) and implications for worldwide colonization patterns. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 90, n. 6, p. 790-797, 1997.

GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P.; SILVA, T. R. S.; FRANÇA, F.; GUEDES, M. L.; AMORIM, A. M. Flora Bahia. **Sietientibus Série Ciências Biológicas**, v. 6, n. 3, p.169-173, 2006.

GODAY, C.; SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P.; GRECIANO, P. G.; RUIZ, M. F. Cytological characterization of sex chromosomes and ribosomal DNA location in *Anastrepha* species. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 114, n.1, p.70-76, 2006.

HAJI, F. N. P.; MIRANDA, I. G. Moscas-das-frutas nos Estados Brasileiros: Pernambuco. In: Zucchi, R.A. and A. Malavasi (eds), **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos Editora, p. 229-233, 2000.

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

HAN, H. Y. MCPHERON, B. A. Phylogenetic study of Tephritidae (Insecta: Diptera) using partial sequences of the mitochondrial 16S ribosomal DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.7,p.17-32,1997.

HARRISON, R. G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 4, p. 6-11, 1989.

HERNÁNDEZ-ORTIZ, V; GÓMEZ-ANAYA, J. A.; SÁNCHEZ, A.; McPHERON, B. A.; ALUJA, M. Morphometric analysis of Mexican and South American populations of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae) and recognition of a distinct Mexican morphotype. **Bulletin of Entomological Research**, v. 94, p. 487-499, 2004.

HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. **Molecular Systematics**. Sunderland, Massachusetts U.S.A. Second Edition. 655 p. 1996.

HURST, G. D. D.; JIGGINS, F. M. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 272, n. 1572, p. 1525-1534, 2005.

IBRAF, INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **Exportação de frutas frescas**. Disponível em: [http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est\\_frutas.asp](http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp) . Acesso em 29/03/08.

JIGGINS, C. D.; BRIDLE, J. R. Speciation in the apple maggot fly: a blend of vintages? **Trends in Ecology and Evolution**, v. 19, n. 3, p.111-114, 2004.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules. In: **Mammalian protein metabolism**. H.N.Munro(ed.). Academic Press, New York. p. 21-132, 1969.

KANN, L.M.;ROSENBLUM, E.B.; RAND, D.M. Aging, mating, and the evolution of mtDNA heteroplasmy in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 5, p. 2372-2377, 1998.

KLATAU, M.; RUSSO, C. A. M.; LAZOSKI, C.; BOURY-ESNAULT, N.; THORPE, J. P.; SÓLE-CAVA, A. M. Does cosmopolitanism result from overconservative systematics? a case study using the marine sponge *Chondrilla nucula*. **Evolution**, v. 53, n. 5, p. 1414-1422, 1999.

KONDO, R.; SATTA, Y.; MATSUURA, E. T.; ISHIWA, H.; TAKAHATA, N.; CHIGUSA, S. I. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. **Genetics**, v. 126, n. 3, p. 657-663, 1990.

KRZWINSKI, J.; BESANSKY, N. J. Molecular Systematics of *Anopheles*: From subgenera to subpopulations. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 111-139, 2003.

LADOUKAKIS, E. D.; ZOUROS, E. Direct evidence for homologous recombination in Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. **Society for Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 7,p.1168-1174, 2001.

LANDRY, C.; GEYER, L. B.; ARAKAKI, Y.; UEHARA, T.; PALUMBI, S. R. Recent speciation in the Indo-west Pacific: rapid evolution of gamete recognition and sperm morphology in cryptic species of sea urchin. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 270,n.1526, p.1839-1847, 2003.

LEHR, M. A.; KILPATRICK, C. W.; WILKERSON, R. C.; CONN, J. E. Cryptic Species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae)

complex: Incongruence between Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction Identification and analysis of mitochondrial DNA COI gene sequences. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 98, n. 6, p. 908-917, 2005.

MALAVASI, A. Áreas-livres ou de baixa prevalência. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil conhecimento básico e aplicado**. São Paulo: Holos Editora, p. 175-181, 2000.

MALAVASI, A.; MORGANTE, J.S. Population genetics of *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae) in different hosts: Genetic differentiation and heterozygosity. **Genetica**, v. 60, n. 3, p. 207-211, 1983.

MALAVASI, A.; MORGANTE, J. S.; ZUCCHI, R. A. Biologia de “moscas-das-frutas” (Diptera:Tephritidae). I: Lista de hospedeiros e ocorrência. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 40, n. 1, p. 9-16, 1980.

MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A; SUGAYAMA, R. L. Biogeografia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil conhecimento básico e aplicado**. São Paulo: Holos Editora, p. 93-98, 2000.

MARTINS, D.S.; URAMOTO, K. MALAVASI, A. Moscas-das-frutas nos Estados Brasileiros: Espírito Santo. In: Zucchi, R.A. and A. Malavasi (eds), **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos Editora, p. 253-258, 2000.

MAYR, E. **Systematics and the origin of species**, New York: Columbia Univ. Press. 1942.

MAYR, E. **What evolution is**. New York : Basic books, 2001, 381p.

McPHERON, B. A. Population genetics and cryptic species, In: K. H. Tan (ed.), **Area-wide Control of Fruit Flies and Other Insect Pests**. Penerbit Universiti Sains Malaysia, Penang, p. 483-490, 1999.

McPHERON, B.; HAN, H.-Y.; SILVA, J. G.; NORRBOM, A . L. Phylogeny of *Anastrepha* and *Toxotrypana* based upon 16S rRNA Mitochondrial DNA Sequences. In: Aluja, M.; Norrbom, A. L. (eds). **Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior**. CRC Press, p. 343-361, 2000.



MEIXNER, M. D.; McPHERON, B. A.; SILVA, J. G.; GASPARICH, G. E.; SHEPPARD, W. S. The Mediterranean fruit fly in California: evidence for multiple introductions and persistent populations based on microsatellite and mitochondrial DNA variability. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 5 p. 891-899, 2002.

MICHEL, A. P.; GRUSHKO, O.; GUELBEOGO, W. M.; LOBO, N. F.; SAGNON, N. F.; CONSTANTINI, C.; BESANSKY, N. J. Divergence with gene flow in *Anopheles funestus* from the Sudan, Savanna of Burkina Faso, West Africa. **Genetics Society of America**, v. 173, n. 3, p. 1389-1395, 2006.

MITROFANOV, V. G.; SOROKINA, S. Y.; ANDRIANOV, B. V. Variation of the mitochondrial genome in the evolution of *Drosophila*. **Russian Journal of Genetica**, v. 38, n. 8. p. 895-907, 2002.

MORGANTE, J. S.; MALAVASI, A.; BUSH, G. L. Biochemical Systematics and Evolutionary Relationships of Neotropical *Anastrepha*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 73, p. 622-630, 1980.

MOREL, F.; RENOUX, M. ALZIARI, S. Mitochondrial biochemical activities and heteroplasmy evolution in established *D. subobscura* cell line. In vitro cellular & developmental biology. **Animal**. v. 42, n. 7, p. 201-207, 2006.

MURRAY, T. E.; FITZPATRICK, U.; BROWN, M. J. F.; PAXTON, R. J. Cryptic species diversity in a widespread bumble bee complex revealed using mitochondrial DNA RFLPs. **Conservation Genetics**. v. 8, n. 4, 2007.

NACHREINER, M. L.; SANTOS, R. R.P.; BOTEON, M. **Janelas de mercado: a fruticultura no mercado internacional**. 2003. Disponível em: [www.cepea.esalq.usp.br/pdf/janelas.pdf](http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/janelas.pdf). Acesso: 07/05/2007

NASCIMENTO, A. S.; CARVALHO, R. S. Manejo integrado de moscas-das-frutas. In: Zucchi, R. A.; Malavasi, A. (eds). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, p. 169-173, 2000a.

NASCIMENTO, A. S.; CARVALHO, R. S. Moscas-das-frutas nos Estados Brasileiros: Bahia. In: Zucchi, R.A.; Malavasi, A. (eds). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, p. 235-239, 2000b.

NASCIMENTO, A. S.; ZUCCHI, R. A. Dinâmica populacional das moscas das frutas do gênero *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) no recôncavo baiano. I: Levantamento das espécies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 16, n. 6, p.763-767, 1981.

NORRBOM, A. L. **Fruit fly (Diptera: Tephritidae) classification and diversity**. 2004. Disponível em:<http://www.sel.barc.usda.gov/diptera/tephriti/Tephclas.htm>. Acesso: 05/05/2007.

NORRBOM, A. L.; ZUCCHI, R. A.; HERNÁNDEZ-ORTIZ, V. Phylogeny of the Genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae; Toxotrypanini) based on morphology. In: Aluja, M.; Norrbom, A. L. (eds). **Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior**. CRC Press, p. 299-342, 2000.

ONYABE, D. Y.; CONN, J. E. Intragenomic heterogeneity of a ribosomal DNA spacer (ITS2) varies regionally in the neotropical malaria vector *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). **Insect Molecular Biology**, v. 8, n. 4, p. 435-442, 1999.

OVRUSKI, S.; SCHLISERMAN, P.; ALUJA, M. Native and introduced host plants of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in northwestern Argentina. **Journal of Economic Entomology**, v. 96, n. 4, p.1108-1118, 2003.

PADUAN, K. S.; RIBOLLA, P. E. M. Mitochondrial DNA polymorfism and heteroplasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 1, p.59-67, 2008.

PETIT-MARTY, N.; VERA, M. T.; CALCAGNO, G.; CLADERA, J. L.; VILARDI, J. C. Lack of post-mating isolation between two populations of *Anastrepha fraterculus* from different ecological regions in Argentina. **Proceedings of the 6th International Fruit Fly Symposium**, p. 79-82, 2004.

RAND, D. M. The units of selection on mitochondrial DNA. **Annual Review of Genetics**, v. 35, p. 125-148, 2001.

RIDLEY, M. **Evolution**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, 752p.

ROKAS, A.; LADOUKAKIS, E.; ZOUROS, E. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, n. 8, p. 411-417. 2003.

ROKAS, J. J.C.; SÁNCHEZ, D.; MESSEGUER, X.; ROKAS, R. Dna SP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v.19, p. 2496-2497, 2007.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SANTOS, P. **Variabilidade genética, isolamento reprodutivo e regra de Haldane em espécies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae)**, 102p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética: um guia prático**. Ribeirão Preto. Holos editora. 114p, 2003.

SCHWARZ, D.; MATA, B. M.; SHAKIR-BOTTERI, N. S.; McPHERON, B. A. Host shift to an invasive plant triggers rapid animal hybrid speciation. **Nature**, v. 436, p. 546-549, 2005.

SELIVON, D. **Estudo sobre a diferenciação populacional em *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae)**, 137 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P. Eggshell morphology in two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 91, n. 4, p. 473-478, 1998.

SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P.; MORGANTE, J. S. A genetic-morphological characterization of two cryptic species of three *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 98, p. 367-381, 2005.

SELIVON, D., VRETOS, C., FONTES, L. PERONDINI, A. L. P. New variant forms in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). **Proceedings of the 6th International Fruit Fly Symposium**, p.253-258, 2004.

SILVA, J.G. **Biologia e comportamento de *Anastrepha grandis* (Macquart, 1846) (Diptera: Tephritidae)**. 135p. Dissertação (Mestrado) Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

SILVA, J. G. Estudos Moleculares. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil conhecimento básico e aplicado**. São Paulo: Holos Editora.p. 29-39, 2000.

SILVA, J. G.; BARR, N. B. Recent advances in molecular systematics of *Anastrepha* Schiner. In: Sugayama, Zucchi, Ovruski e Sivinski. **Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance**. Sociedade Entomologica do Brasil (no prelo).

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, p. 651-701, 1994.

SIMON, C.; BUCKLEY, T. R.; FRATI, F.; STEWART, J. B.; BECKENBACH, A. T. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 37, p. 545-579, 2006.

SITES Jr, J.W.; MARSHALL, J. C. Operational criteria for delimiting species. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 35, p. 199-227, 2004.

SMITH, A. M.; WOODLEY, N. E.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W.; HEBERT, P. D. N. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera:Tachinidae). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 10, p. 3657-3662, 2006.

SMITH-CALDAS, M. R. B. **Variabilidade genética, em espécies de *Anastrepha* do grupo *fraterculus* (Diptera: Tephritidae) através do sequenciamento de genes do DNA mitocondrial e análise de RFLP**, 100p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo, 2001.

SMITH-CALDAS, M. R. B., McPHERON, B. A.; SILVA, J. G.; ZUCCHI, R. A. Phylogenetic relationships among species of the *fraterculus* group (*Anastrepha*:

Diptera: Tephritidae) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 4, p. 565-573, 2001.

SMITH, J. J.; BUSH, G. L. Phylogeny of the Genus *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae) Inferred from DNA Sequences of Mitochondrial Cytochrome Oxidase II. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 33-43, 1997.

SOUZA-FILHO, M.F.de. **Infestação de moscas-das-frutas(Diptera: Tephritidae e Lonchaeidae) relacionada à fenologia da goiabeira (*Psidium guajava* L.), nespeira (*Eriobotrya japonica* Lindl) e pessegueiro (*Prunus persica* Batsch)**, 126p. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura “Luís de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

SOUZA-FILHO, M. F.; RAGA, A.; ZUCCHI, R. A. Moscas-das-frutas nos Estados Brasileiros: São Paulo. In: Zucchi, R. A.; Malavasi, A. (eds), **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos Editora, p. 277-2284, 2000.

SOUZA-FILHO, Z. A.; ARAUJO, E. L.; GUIMARÃES, J. A.; SILVA, J. G. Endemic parasitoids associated with *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) infesting guava (*Psidium guajava*) in southern Bahia, Brazil, **Florida Entomologist**, v. 90, n. 4, p. 783-785, 2007.

STECK, G. J. Biochemical systematics and population genetic structure of *Anastrepha fraterculus* and related species (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 84, p. 10-28, 1991.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

THYSSEN, P. J.; LESSINGER, A. C.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L.; LINHARES, A. X. The value of PCR- RFLP molecular markers for the differentiation of immature stages of two necrophagous flies (Diptera: Calliphoridae) of potential forensic importance. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 777-783, 2005.

TOMPSON, C. F. The diptera site: Information about the Word's flies. Disponível em: <http://www.sel.barc.usda.gov/diptera/flies.htm>. Acesso: 13/07/2007.

URAMOTO, K.; WALDER, J. M. M.; ZUCCHI, R. A. Biodiversidade de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* (Diptera, Tephritidae) no campus da ESALQ-USP, Piracicaba, São Paulo. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 48, n. 3, p. 409-414, 2004.

WHITE, I. M.; ELSON-HARRIS, M. M. **Fruit Flies of Economic significance: Their Identification and Bionomics**. CAB International, Wallingford, UK., 601p., 1992.

YAKES, M. F.; VAN HOUTEN, B. Mitochondrial DNA damage in human cells following oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 2, p. 514-519, 1997.

ZHANG, D-Z.; HEWITT, G. M. Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, n. 2, p.99-120, 1997.

ZUCCHI, R. A. **Taxonomia de espécies de *Anastrepha* Schiner, 1868 (Diptera: Tephritidae) assinaladas no Brasil**, 105 p. Tese (Doutorado), Escola Superior de Agricultura "Luís de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 1978.

ZUCCHI, R. A. Taxonomia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.) 2000. **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos Editora, p. 13-24, 2000a.

ZUCCHI, R. A. Espécies de *Anastrepha*, sinónimas, plantas hospedeiras e parasitóides. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.) **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos Editora, p. 41-48, 2000b.

ZUCCHI, R. A., Diversidad, distribución y hospederos del género *Anastrepha* em Brasil. In:Hernández-Ortiz(Ed.). **Moscas de la fruta em Latinoamérica (Diptera:Tephritidae): Diversidad, biología y manejo**. SyG editores, México, p.77-100, 2007.

## **9. APÊNDICES**









```
#I bi rata -----  
#I bi rat2 -----  
#i tacare TAGATCTTCCAGC  
#unaj amb TAGATCTTCCAGC  
#Unapi ta TAGATCTTCCAGC  
#Por tj am TAGATCTTCCAGC  
#I tabul I TAGATCTTCCAGC  
#Ubai rag TAGATCTTCCAGC  
#Ji tauna TAGATCTTCCAGC  
#Spaul ol TAGATCTTCCAGC  
#SPaul o2 TAGATCTTCCAGC  
#i TI RUC1 TAGATCTTCCAGC  
#i TI RUCU TAGATCTTCCAGC  
#I i vram1 TAGATCTTCCAGC  
#I i vramt TAGATCTTCCAGC  
#I tabuna TAGATCTTCCAGC  
#I tabl I I TAGATCTTCCAGC  
#FrtSMal TAGATCTTCCAGC  
#FrtSMI I TAGATCTTCCAGC  
#FrtSMI I I TAGATCTTCCAGC  
#Val cpi t TAGATCTTCCAGC  
#Val goi a TAGATCTTCCAGC  
#Val j abu TAGATCTTCCAGC  
#Frt Tape TAGATCTTCCAGC  
#Frt Tap1 TAGATCTTCCAGC  
#Frt Cama TAGATCTTCCAGC  
#I tubera TAGATCTTCCAGC
```

## Apêndice B: Distâncias calculadas pelo método de Jukes-Cantor para todas as amostras sequenciadas gene ND6.

- [ 1] #A. serpentina
- [ 2] #A. sororcula Bahia
- [ 3] #A. obliqua
- [ 4] #A. fraterculus Ubaíra (BA)
- [ 5] #A. fraterculus St.Maria (BA)
- [ 6] #A. fraterculus Anagé (BA)
- [ 7] #A. fraterculus Ibirataia (BA)
- [ 8] #A. fraterculus Ibirataia (BA)
- [ 9] #A. fraterculus Itacaré
- [10] #A. fraterculus Una (BA) jambo
- [11] #A. fraterculus Una (BA) pitanga
- [12] #A. fraterculus Porto Seguro (BA) jambo
- [13] #A. fraterculus Itabuna (BA) II
- [14] #A. fraterculus Jitaúna (BA)
- [15] #A. fraterculus São Paulo I- Laranjal Paulista (SP)
- [16] #A. fraterculus São Paulo II- Laranjal Paulista (SP)
- [17] #A. fraterculus Itiruçu (BA)
- [18] #A. fraterculus Itiruçu (BA)
- [19] #A. fraterculus L.N. Senhora (BA)
- [20] #A. fraterculus L.N. Senhora (BA)
- [21] #A. fraterculus Itabuna (BA)
- [22] #A. fraterculus Itabuna (BA)
- [23] #A. fraterculus São Mateus (ES)
- [24] #A. fraterculus São Mateus (ES)II
- [25] #A. fraterculus São Mateus (ES)III
- [26] #A. fraterculus Valença (BA) pitanga
- [27] #A. fraterculus Valença (BA)
- [28] #A. fraterculus Valença (BA)jabuticaba
- [29] #A. fraterculus Taperóá (BA)
- [30] #A. fraterculus Taperóá (BA)
- [31] #A. fraterculus Camamu (BA)
- [32] #A. fraterculus Ituberá (BA)
- [33] #A. fraterculus Chapecó (SC)
- [34] #A. fraterculus Vacaria (RS)
- [35] #A. fraterculus Cananeia (SP)
- [36] #A. fraterculus Campinas (SP)
- [37] #A. fraterculus Janaúba (MG)
- [38] #A. fraterculus Linhares (ES)
- [39] #A. fraterculus São João da Bela Vista (SP)
- [40] #A. amita
- [41] #A. obliqua Campinas (SP)
- [42] #A. obliqua Janaúba (MG)
- [43] #A. obliqua Linhares (ES)
- [44] #A. obliqua Narandiba (SP)
- [45] #A. obliqua Natal (RN)
- [46] #A. obliqua Presidente Prudente (SP)
- [47] #A. obliqua Patroc. Paulista (SP)
- [48] #A. sororcula Guará (SP)
- [49] #A. sororcula Mossoró (RN)
- [50] #A. sororcula Rosana (SP)
- [51] #A. sororcula Tabaraí (SP)
- [52] #A. turpiniae Santa Inês (MA)
- [53] #A. zenildae Lagoinha (MA)
- [54] #A. zenildae Mossoró (RN)



Apêndice C: Tamanhos dos fragmentos em heteroplasma encontrados em indivíduos de *A. fraterculus* em diferentes localidades do estado da Bahia e em Laranjal Paulista (SP).

Localidade (Amostra)	Tamanhos dos fragmentos					
	459	347	281	180	118	86
Laranjal Paulista (SP)						
A1	x		x		x	
A2					x	
Itabuna (BA)						
A1		x		x		
A2		x		x		
A3				x	x	
A4				x		
A5				x		
Nova Ibiá (BA)						
A1				x		X
A2				x	x	
A3				x	x	
Itacaré (BA)						
A1					x	
A2				x	x	
A3					x	
Itiruçu (BA)						
A1				x		
A2				x		