**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Diversidade genética de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera:
Psyllidae) e caracterização molecular das linhagens de *Wolbachia*
associadas**

Aline Sartori Guidolin

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2011**

Aline Sartori Guidolin
Bacharel em Ciências Biológicas

**Diversidade genética de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae) e
caracterização molecular das linhagens de *Wolbachia* associadas**

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO LUIS CÔNSOLI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

Piracicaba
2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Guidolin, Aline Sartori

Diversidade genética de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae) e caracterização molecular das linhagens de *Wolbachia* associadas / Aline Sartori Guidolin. - Piracicaba, 2011.

126 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Bactérias 2. Diversidade genética 3. DNA mitocondrial 4. Genética de populações
5. Insetos vetores 6. Simbiose I. Título

CDD 632.752
G948d

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

DEDICATÓRIA

A Deus, que dirige meus passos...
E aos meus queridos pais, Joceli e Alcides,
que me amam e apoiam sempre

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação não teria sido desafiadora, divertida e enriquecedora sem a presença de muitos amigos e excelentes profissionais com quem tive a honra de conviver ao longo desses anos. Meu muitíssimo obrigada:

Ao Prof. Fernando Luis Cômoli, meu orientador, exigente, cheio de ideias e de frases completas, do qual eu tive a imensa sorte de ser estagiária desde o começo da minha formação, obrigada por ajudar a fazer de mim uma profissional e uma pessoa melhor;

Ao Dr. Pablo Fresia Coronel, pela imensurável ajuda com todos os programas e conceitos de genética de populações, sem você não sei se teria conseguido;

À Dra Karina Lucas Silva-Brandão, por ser uma excelente professora e por muitas pequenas e cruciais observações, você me fez prestar atenção aos detalhes;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, pelos conhecimentos compartilhados;

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da ESALQ, por compartilharem comigo muitas alegrias e sorrisos;

À amiga Aline Peruchi, pela grande ajuda com a edição de imagens, obrigada por ser tão talentosa;

À amiga Luiza Zazycki, pelas muitas histórias engraçadas, nossos almoços me renovaram para seguir escrevendo às tardes;

A todos os meus colegas do Laboratório de Interações em Insetos e agregados: Priscila Fortes, Karina Lucas Silva-Brandão, Pablo Fresia Coronel, Guilherme Duarte Rossi, Daniele Thomazoni, Fábio Dossi, Luiza Zazycki, Fernanda Appel Muller, Luis Gustavo de Almeida, Aline Peruchi, Amanda Rodrigues de Souza, Jaci Mendes Vieira, Felipe Domingues, Amanda Santos

Oliveira, Helen Breyer e Thiago Vieira dos Santos, galera trabalhar com vocês é ótimo, não poderia escolher turma melhor para dividir meus dias;

A todos os outros alunos, convidados e pós-doutores que passaram pelo laboratório e eu tive a honra de poder ajudar, vocês acrescentaram muito a minha formação;

Às amigas: Larissa Spoladore, Gabriela Salvador e Izabela Salvador, com as quais eu tive a alegria de compartilhar o começo de tudo, revezar a única cadeira do laboratório com vocês foi demais;

Às minhas queridas amigas desde o primeiro dia da graduação e pelo resto da minha vida: Aline Bertolosi Bombo, Eveline Calderan, Juliana da Lima Matos, Keini Dressano, Mariana da Silva Azevedo e Thais Degasperri, vocês são meus exemplos e incentivo;

Ao Grupo de Oração Universitário da ESALQ – “Água viva”, por semanalmente me lembrar do amor de Deus na minha vida;

Aos meus pais e toda a minha família, que apesar de não fazer ideia do que eu faço sempre me apoiam e aplaudem com orgulho;

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e desta mestranda♥

EPÍGRAFE

*"O distraído nela tropeçou.
O bruto a usou como projétil.
O empreendedor, usando-a, construiu.
O camponês, cansado da lida, dela fez assento.
Para meninos, foi brinquedo.
Drummond a poetizou:
- Já, David matou Golias, e Michelangelo extraiu-lhe a mais bela escultura...
E em todos esses casos, a diferença não esteve na pedra, mas no Homem!
Não existe 'pedra' no seu caminho que você não possa aproveitá-la para o
seu próprio crescimento."*

Autor: Fenelon Portilho

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
Referências	22
2 DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama, 1908 (HEMIPTERA: PSYLLIDAE)	27
Resumo	27
Abstract	28
2.1 Introdução	28
2.2 Desenvolvimento	31
2.2.1 Revisão bibliográfica	31
2.2.1.2 <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae).....	31
2.2.1.2 Genética de populações.....	33
2.2.2 Material e métodos	38
2.2.2.1 Locais de coleta.....	38
2.2.2.2 Extração do DNA genômico.....	38
2.2.2.3 Amplificação e sequenciamento do gene da citocromo oxidase I.....	41
2.2.2.4 Diversidade genética de <i>Diaphorina citri</i>	42
2.2.2.5 Análises bayesianas.....	43
2.2.2.6 Origem de <i>Diaphorina citri</i> introduzida no Brasil.....	43
2.2.3 Resultados	44
2.2.4 Discussão	54
2.3 Conclusões	58
Referências	58
3 CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE <i>Wolbachia</i> ASSOCIADAS A <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama, 1908 (HEMIPTERA: PSYLLIDAE)	69
Resumo	69
Abstract	70

3.1 Introdução	70
3.2 Desenvolvimento	74
3.2.1 Revisão bibliográfica	74
3.2.1.2 Simbiontes associados a insetos	74
3.2.1.2 <i>Wolbachia</i>	78
3.2.1.3 Interação entre simbiontes herdados e o DNA mitocondrial	82
3.2.2 Material e métodos	84
3.2.2.1 Coleta e manipulação de populações	84
3.2.2.2 Extração do DNA genômico	85
3.2.2.3 Determinação da frequência natural de infecção de <i>Diaphorina citri</i> por <i>Wolbachia</i>	85
3.2.2.4 Determinação do Supergrupo de <i>Wolbachia</i>	88
3.2.2.5 Caracterização da linhagem de <i>Wolbachia</i> por meio da técnica de MLST	89
3.2.2.6 Análises das sequências obtidas por MLST e do gene <i>wsp</i>	90
3.2.2.7 Análises filogenéticas	91
3.2.2.8 Amplificação e sequenciamento do DNA mitocondrial	92
3.2.2.9 Análise de diversidade genética de <i>Diaphorina citri</i> associada a <i>Wolbachia</i>	92
3.2.3 Resultados	95
3.2.4 Discussão	104
3.3 Conclusões	106
Referências	107
ANEXO	123

RESUMO

Diversidade genética de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae) e caracterização molecular das linhagens de *Wolbachia* associadas

Diaphorina citri Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae) é um inseto exótico no Brasil, registrado desde a década de 40. Apesar dos danos diretos que pode causar, só recebeu atenção como praga em 2004, quando foi confirmada a doença “Huanglongbing” (HLB) em citros, a qual foi posteriormente relacionada a *D. citri* como inseto-vetor. Atualmente, não há cura para plantas doentes. Portanto, o manejo do HLB é baseado na retirada de árvores infectadas e no controle dos psílídeos, o qual se fundamenta no controle biológico clássico, ação natural de predadores e no controle químico. Porém, o uso contínuo e intenso de agrotóxicos é sempre problemático devido ao desequilíbrio que pode causar nos agroecossistemas. Portanto, investigar as populações de *D. citri* no Brasil e discutir possíveis medidas alternativas para o controle ou manejo do vetor/doença são desejáveis. Assim, este trabalho apresenta como objetivos i) avaliar a diversidade genética intra e interpopulacional de *D. citri* e verificar a existência de estruturação populacional no Brasil, especialmente entre as populações que se distribuem na principal região citrícola do país; ii) determinar a ocorrência e frequência de infecção por *Wolbachia* em diferentes populações desse psílídeo, além de caracterizar a diversidade desse simbiote e definir a relação entre os haplótipos do hospedeiro e as linhagens de *Wolbachia*, visando fornecer subsídios para o controle alternativo deste inseto-vetor. A análise de diversidade genética utilizou o gene da citocromo oxidase I (*COI*) como marcador molecular. Os cálculos dos índices de fixação *F* indicaram a presença de estrutura genética e os cálculos dos índices de diversidade molecular mostraram um quadro de expansão populacional recente. Já a caracterização de *Wolbachia* via tipagem pela análise de sequências de multilocus (“multilocus sequencing typing - MLST”) indicou a ocorrência de cinco STs (173, 174, 175, 225 e 236), enquanto que análises das sequências do *wsp* indicaram quatro tipos de *Wolbachia*. O ST-173 foi predominante, estando presente em todas as populações, enquanto que os demais foram populações-específicos. Análises da relação hospedeiro-simbiote não revelou a existência de relações específicas entre os haplótipos do hospedeiro e os STs de *Wolbachia*, nem a diminuição da diversidade nucleotídica de *D. citri* frente à infecção por mais de um ST do simbiote. A relação entre os STs de *Wolbachia* e as consequências desta diversidade na bioecologia do hospedeiro ainda permanecem desconhecidas, mas a constatação de que *Wolbachia* ocorre em todas as populações e de que há um ST com distribuição abrangente abre caminhos para a utilização desse simbiote no desenvolvimento de estratégias alternativas de controle de *D. citri*.

Palavras-chave: DNA mitocondrial; Genética de populações; MLST; Simbiote

ABSTRACT

Genetic diversity of *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae) and molecular characterization of the associate strains of *Wolbachia*

Diaphorina citri Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae) is an exotic insect in Brazil, first recorded in the 40s. Although it causes direct damage, *D. citri* only received attention as a pest in 2004, when the "Huanglongbing" (HLB) disease was confirmed infecting citrus in Brazil, and subsequently related to *D. citri* as vector. Currently, there is no cure for diseased plants, and the management of HLB is based on the removal of infected trees and psyllid control, which is based on classical biological control, natural predation and chemical control. However, the continuous use of pesticides is always problematic due to the imbalance it can cause in agrosystems. Therefore, investigations on the population's structure of *D. citri* in Brazil and possible alternative measures for vector/disease control or management are highly desired. Thus, this study was aimed to i) evaluate the intra and interpopulation genetic diversity of *D. citri* and verify the existence of population structuring in Brazil, especially in the main citrus producing region of the country, ii) determine the natural rate of infection and characterize the *Wolbachia* strains associated with different populations of *D. citri* and iii) investigate the relationship among host haplotypes –and the strains of *Wolbachia*, in order to provide data for the alternative control of this vector. The analysis of genetic diversity was done using the cytochrome oxidase I (COI) gene as a molecular marker. The fixation rates F calculated indicated the presence of genetic structure, while the molecular diversity indices pointed to a recent population expansion of *D. citri* in Brazil. The multilocus sequence typing analysis ("multilocus sequencing typing - MLST") for *Wolbachia* demonstrated the presence of five new sequence-types (STs = 173, 174, 175, 225 and 236), while only four were identified when using the *wsp* sequences as markers. The ST-173 was the predominant ST associated with *D. citri*, being present in all populations, while others were specific to certain populations. Analysis of the host-symbiont relationship did not reveal the existence of specific interactions between host haplotypes and the STs of *Wolbachia*, or the decrease of nucleotide diversity of *D. citri* in populations infected by more than one ST. The effects of *Wolbachia* diversity on the host bioecology are still unknown, but the fact that *Wolbachia* is fixed in all populations and that there is a ST broadly distributed throughout the *D. citri* populations highlights the use of *Wolbachia* for the development of alternative strategies to control *D. citri*.

Keywords Mitochondrial DNA; Population genetics; MLST; Symbionts

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 – Rede de haplótipos de *Diaphorina citri* amostrados em diversas populações do Brasil, gerada no programa TCS a partir de sequências parciais de citocromo oxidase I (996 bases). Linhas finas representam mutações sinônimas, enquanto as grossas indicam mutações não-sinônimas. Círculos de coloração cinza representam haplótipos únicos.47
- Figura 2.2 - Distribuição geográfica dos haplótipos de *Diaphorina citri* identificados nas populações analisadas. Localidades: Minas Gerais: 1 - Divinópolis; Mato Grosso do Sul: 2 - Três Lagoas; Paraná: 3 - Maringá; São Paulo: 4 - Araraquara, 5 - Bandeirantes D'Oeste, 6 - Barretos, 7 - Bebedouro, 8 - Urupês, 9 - Botucatu, 10 - Cafelândia, 11 - Cardoso, 12 - Casa Branca, 13 - Cerqueira César, 14 - Espírito Santo do Turvo, 15 - Guarantã, 16 - Itapetininga, 17 - Itirapina, 18 - Mogi Mirim, 19 - Monte Alto, 20 - Nova Granada, 21 - Novo Horizonte, 22 - Palestina, 23 - Palmeira D'Oeste, 24 - Penápolis, 25 - Piracicaba, 26 - Pongái, 27 - Potirendaba, 28 - Regianópolis, 29 - Riberão Preto, 30 - Sales, 31 - Santa Cruz da Conceição, 32 - Santa Fé do Sul, 33 - São Carlos, 34 - Sud Mennucci, 35 - Três Fronteiras; Roraima: 36 – Boa Vista.....48
- Figura 2.3 – Distribuição das frequências do número de diferenças pareadas (“mismatch distribution”) entre as populações de *Diaphorina citri*. A) Referente ao grupo 1 e grupo 3, definido nas análises de SAMOVA e grupo único; B) Referente ao grupo 2 (compostas primordialmente por haplótipos únicos), assim como definido nas análises de SAMOVA.51
- Figura 2.4 – “Bayesian Skyline Plot” baseado na análise de todas as populações de *Diaphorina citri* amostradas no Brasil. A linha preta representa a mediana, enquanto as azuis mostram os limites 95% HPD (high posterior density). .52
- Figura 2.5 – Árvore de Neighbor-Joining demonstrando a distância entre os diversos haplótipos de *Diaphorina citri* de populações do Brasil e de várias regiões do mundo utilizando o modelo de distância p, com 1.000 replicações de bootstrap. Os táxons psy (número) representam as sequências depositadas no NCBI, sendo o número referente à sua localidade. Os táxons Hap (número) se referem aos haplótipos definidos neste trabalho.53
- Figura 3.1 – Distribuição relativa da associação das sequências-tipo (STs) de *Wolbachia* aos diferentes locais de coleta de *Diaphorina citri*97
- Figura 3.2 – Relações filogenéticas das sequências-tipo (STs) de *Wolbachia* associadas a *Diaphorina citri* no Brasil em comparação aos STs associados às diferentes espécies de insetos hospedeiros desse simbiote, utilizando as sequências concatenadas dos marcadores moleculares utilizados na tipagem via sequenciamento de multilocus (MLST). A) Método bayesiano

(Os valores indicam clados com probabilidade posterior > 80%); B) Árvore de Neighbor-joining com modelo de distância p (Unidades colocadas nas intersecções dos ramos representam os valores de “bootstrap”). Os táxons marcados em vermelho são os STs definidos neste trabalho. 99

Figura 3.3- Árvore filogenética baseada na análise bayesiana de linhagens de *Wolbachia* associadas a *Diaphorina citri* e diversos outros insetos hospedeiros, utilizando sequências do gene *wsp*. Os valores colocados nas intersecções dos ramos indicam clados com probabilidade posterior > 80%. 100

Figura 3.4 – Distribuição relativa (A) dos haplótipos de *Diaphorina citri* nas diversas populações analisadas e (B) da associação das sequências-tipo (STs) de *Wolbachia* aos diferentes haplótipos de *D. citri*. Dados de frequência entre as seguintes variáveis: A) Relação população-haplótipo (em A, colunas em branco representam haplótipos únicos, sendo a identificação dos mesmos grafada no interior de cada coluna; em B, a coluna “Outros” representa todos os haplótipos, com exceção do 1, 9 e 10). 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Dados referentes às localidades, data de coleta, coletor, planta hospedeira e número de indivíduos (N) de <i>Diaphorina citri</i> coletados/localidade.....	40
Tabela 2.2 – Denominação e frequência de haplótipos encontrados em diferentes populações de <i>Diaphorina citri</i> no Brasil.....	45
Tabela 2.3 - Grupos geneticamente homogêneos e geograficamente isolados de <i>Diaphorina citri</i> definidos a partir do programa SAMOVA 1.0.	49
Tabela 2.4 - Análise molecular de variância (AMOVA) para as amostras de <i>Diaphorina citri</i> baseada no gene COI considerando as amostras com um único grupo ou como os três grupos definidos pelas análises do SAMOVA 1.0.	50
Tabela 2.5 - Resumo das estatísticas de diversidade genética em <i>Diaphorina citri</i> , como grupo único e com os três grupos definidos a partir do programa SAMOVA 1.0 (DP= desvio padrão).	51
Tabela 3.1 – Origem, data de coleta, hospedeiro e número de indivíduos amostrados das populações de <i>Diaphorina citri</i> analisadas.	87
Tabela 3.2 – Marcadores moleculares, iniciadores e temperaturas de anelamento utilizados para a caracterização molecular de linhagens de <i>Wolbachia</i> associadas às populações naturais de <i>Diaphorina citri</i> via MLST (BALDO et al., 2006).	90
Tabela 3.3 - Identificação das sequências provenientes dos bancos de dados de MLST (A) e <i>wsp</i> (B) para as análises genéticas com as sequências obtidas para as diferentes <i>Wolbachia</i> associadas às populações de <i>Diaphorina citri</i> no Brasil.	93
Tabela 3.4 - Composição alélica dos STs de <i>Wolbachia</i> associados às diferentes populações de <i>Diaphorina citri</i> no Brasil.	95
Tabela 3.5 - Composição alélica do gene <i>wsp</i> e das quatro regiões hipervariáveis (HVR) de <i>Wolbachia</i> associadas às diferentes populações de <i>Diaphorina citri</i> no Brasil, Estados Unidos e Uruguai.	97
Tabela 3.6 – Medidas de diversidade haplotípica ($\pm$ DV) e diversidade nucleotídica ($\pm$ DV) geral e de cada população de <i>Diaphorina citri</i> em que <i>Wolbachia</i> foi caracterizada.	102

1 INTRODUÇÃO

A diversidade genética é uma medida de variação genética de uma espécie que pode estar separada em subpopulações por barreiras geográficas, biológicas ou genéticas. Essas subpopulações, chamadas de populações locais ou demes, são fundamentais na genética de populações porque é dentro delas que a evolução adaptativa acontece por meio da mudança nas frequências alélicas. Essas mudanças ocorrem porque os demes ficam total ou parcialmente isolados entre si, permitindo que forças diferentes atuem sobre cada local (HARLT; CLARK, 2010).

O desenvolvimento dessas subpopulações, dada pela estruturação das populações, tem impacto na variabilidade genética, pois as subpopulações podem se tornar geneticamente diferentes na ausência de fluxo gênico. Dessa forma, à medida que ocorre o isolamento genético entre as diferentes populações de uma espécie e as pressões de seleção existentes passam a favorecer fenótipos em particular, é possível o desenvolvimento de populações que passem a apresentar preferência hospedeira distinta, alterações no período de acasalamento e desenvolvimento, na eficiência de transmissão de patógenos, na suscetibilidade a predadores, parasitoides e agroquímicos, na tolerância a condições climáticas mais intensas, entre outras mudanças dependentes da interação ambiente – população (CARMICHAEL et al., 2007; PINHO; HARRIS; FERRAND, 2007; JOURDIE et al., 2010; REMAIS et al., 2011). Assim, a estruturação populacional tem implicações diretas no desenvolvimento de programas de conservação de espécies ameaçadas de extinção e/ou manejo de espécies pragas (PORRETTA et al., 2007; SEGELBACHER et al., 2010).

O gene da citocromo oxidase I (COI) do DNA mitocondrial se destaca como um dos marcadores moleculares mais utilizados para estudos de genética de populações. Esta molécula é muito utilizada por apresentar algumas características interessantes como a rápida taxa de mutação (BROWN et al., 1982), a ausência de recombinação (MAYNARD SMITH; SMITH, 2002), a herança materna (BIRKY et al 1989), a estrutura genética simples e o reduzido tamanho efetivo populacional (AVISE et al., 1987; MOORE, 1995). Além da facilidade técnica, o que permite trabalhar com amostras de museus e com quantidades mínimas de material (MORIN; MOORE; WODRUFF, 1992).

O estado de São Paulo é a maior região citrícola do país e apresenta uma área de 248.196,960 Km², maior que a de alguns países da Europa, sendo possível a formação de subpopulações. Ainda, o estado contém dois biomas principais, Mata Atlântica e Cerrado, além de uma gama de variações climáticas como regiões de serra, floresta úmida e semidecídua e regiões áridas (IBGE, 2010). Essas diferenças climáticas são muito importantes porque vários fatores ambientais (regiões climáticas distintas, disponibilidade da planta hospedeira, mudanças no comportamento devido às características locais), além de genéticos podem levar à estruturação de populações (JARNE; THERON, 2001; ESTOUP et al., 2004; AOKI; KATO; MURAKAMI, 2008; LI et al., 2011).

Diaphorina citri Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae) é um inseto exótico, registrado no Brasil desde a década de 40 (COSTA LIMA, 1943). Apesar dos danos diretos que pode causar, só recebeu atenção como praga em 2004, quando foi confirmada a doença “Huanglongbing” (HLB) em citros (TEIXEIRA et al., 2005b), a qual foi posteriormente relacionada a *D. citri* como inseto vetor (YAMAMOTO et al., 2009). O HLB é fatal para o citros, e a única prática de controle eficaz é a retirada de plantas infectadas no início da doença. Porém, é muito difícil identificar essas plantas, visto que a mesma permanece assintomática nos primeiros anos (BOVÉ, 2006). A doença é causada por bactérias Gram-negativas limitadas ao floema e não são de fácil cultivo (SECHLER et al., 2009). Três bactérias causadoras de HLB são conhecidas, a africana, a asiática e a americana, todas transmitidas exclusivamente por psílídeos. A africana, *Candidatus Liberibacter africanus*, é transmitida por *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Hemiptera: Psyllidae), enquanto que a asiática (*Ca. L. asiaticus*) e a americana (*Ca. L. americanus*) são transmitidas por *D. citri* (TEIXEIRA et al., 2005a, 2005b, COLETTA-FILHO et al., 2004, BOVÉ, 2006)

A forma asiática de HLB foi detectada em São Paulo por técnicas moleculares e caracterização de sintomas nas árvores do estado. Contudo, em 2005, Teixeira e colaboradores encontraram bactéria diferente associada às plantas doentes de São Paulo. Após estudos moleculares, constatou-se ser uma nova espécie de *Ca. Liberibacter*, designada como *Ca. L. americanus*, também transmitida por *D. citri* (COLETTA-FILHO et al., 2005). Atualmente, não há cura para plantas doentes.

Portanto, o manejo do HLB é baseado no controle do psíldeo e na retirada de árvores infectadas, visando à diminuição da disseminação da doença para plantas sadias (LOPES et al., 2007). Desta forma, os programas atuais de manejo de *D. citri* incluem o controle biológico clássico, o controle natural pela ação de predadores e o controle químico (SKELLEY; HOY, 2004; YAMAMOTO et al., 2009).

Porém, o uso contínuo e intenso de agrotóxicos é sempre problemático devido ao desequilíbrio que pode causar nos agroecossistemas, eliminando espécies benéficas, contaminando o solo, cursos de água e o lençol freático, sem contar nos problemas decorrentes da seleção de genótipos do inseto resistentes à agrotóxicos (BASS; FIELD, 2011). Assim, medidas alternativas que permitam o controle ou manejo do vetor/doença são desejáveis e, dentre as novas abordagens disponíveis, a utilização de simbiossitos associados ao inseto tem se destacado como estratégia alternativa para o controle de insetos pragas ou de doenças por eles transmitidas (DURVASULA et al., 1997; ZABALOU et al., 2004; RUANG-AREERATE; KITTAYAPONG, 2006). A utilização de simbiossitos no controle alternativo de *D. citri* é uma possibilidade, visto a sua associação com simbiossitos primários e secundários (SUBANDIYAH et al., 2000). *Wolbachia* tem sido relatada infectando várias populações desse psíldeo (SUBANDIYAH et al., 2000; MEYER; HOY, 2008) e tem sido o simbiote mais estudado para o desenvolvimento de estratégias de controle, seja do inseto-praga ou dos patógenos por eles veiculados (COOK; MCGRAW, 2010).

Wolbachia é um simbiote citoplasmático manipulador da determinação de sexos em insetos, favorecendo sua disseminação na população do hospedeiro induzindo um ou mais de seus quatro efeitos sobre o hospedeiro: incompatibilidade citoplasmática (IC) (YEN; BARR, 1971), feminização de machos (ROUSSET; VAUTRIN; SOLIGNAC, 1992), morte de machos (HURST et al., 1999) e indução de telitoquia (STOUTHAMER, 1993). A capacidade desse simbiote em alterar o desenvolvimento e os processos mitóticos de seus hospedeiros despertou que permitiriam sua utilização em i) sistemas de produção massal de parasitoides para programas de controle biológico via indução de telitoquia, permitindo exclusivamente a produção de fêmeas (STOUTHAMER 1993), ii) no desenvolvimento de técnicas de incompatibilidade em insetos (ZABALOU et al., 2004, 2009), iii) no combate a insetos vetores via redução da aptidão do hospedeiro ou

de sua capacidade vetora (KAMBRIS et al., 2009; MCMENIMAN et al., 2009) ou iv) como vetor de modificações genéticas desejáveis nas populações de insetos (DOBSON, 2003; KLASSON et al., 2009).

Porém, para considerar *Wolbachia* como possível meio de desenvolvimento de métodos alternativos de controle, é crucial a compreensão de vários fatores que influenciam a atuação deste simbiote, tais como a localização da bactéria nos diferentes tecidos do hospedeiro, a intensidade de infecção, o genoma do hospedeiro e a linhagem de *Wolbachia* presente (WEEKS et al., 2002; BROWNLIE et al., 2007; JAENIKE, 2009).

Assim, este trabalho apresenta como objetivos i) avaliar a diversidade genética intra e interpopulacional de *D. citri* e verificar a existência de estruturação populacional no Brasil, especialmente entre as populações que se distribuem na principal região citrícola do país; ii) determinar a ocorrência e frequência de infecção por *Wolbachia* em diferentes populações desse psíldeo, além de caracterizar a diversidade desse simbiote e definir a relação haplótipos do hospedeiro-linhagem de *Wolbachia*, visando fornecer subsídios para o controle alternativo deste inseto-vetor.

Referências

AOKI, K.; KATO, M.; MURAKAMI, N. Glacial bottleneck and postglacial recolonization of a seed parasitic weevil, *Curculio hilgendorfi*, inferred from mitochondrial DNA variation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 14, p. 3276-3289, July 2008.

BASS, C.; FIELD, L.M. Gene amplification and insecticide resistance. **Pest Management Science**, Sussex, v. 67, n. 8, p. 886-890, Aug. 2011.

BIRKY, C.W. Evolution and population genetics of organelle genes - Mechanisms and models. In: SYMPOSIUM ON EVOLUTION AT THE MOLECULAR LEVEL, 1991, Pennsylvania. **Proceedings...** Pennsylvania: Penn State University, 1991. p. 112-134.

BOVE, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 88, n. 1, p. 7-37, Mar. 2006.

BROWN, W.M.; PRAGER, E.M.; WANG, A.; WILSON, A.C. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 18, n. 4, p. 225-239, Feb. 1982.

BROWNLIE, J.C.; ADAMSKI, M.; SLATKO, B.; MCGRAW, E.A. Diversifying selection and host adaptation in two endosymbiont genomes. **Bmc Evolutionary Biology**, London, v. 7, p. 12, Apr. 2007.

CARMICHAEL, L.E.; KRIZAN, J.; NAGY, J.A.; FUGLEI, E.; DUMOND, M.; JOHNSON, D.; VEITCH, A.; BERTEAUX, D.; STROBECK, C. Historical and ecological determinants of genetic structure in arctic canids. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, n. 16, p. 3466-3483, Aug. 2007.

COLETTA, H.D.; TAKITA, M.A.; TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A. Analysis of 16S rDNA sequences from citrus huanglongbing bacteria reveal a different "*Ca. Liberibacter*" strain associated with citrus disease in São Paulo. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 8, p. 848-852, Aug. 2005.

COLETTA, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU, J.; MACHADO, M.A.; MULLER, G.W. First report of the causal agent of huanglongbing ("*Candidatus Liberibacter asiaticus*") in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 12, p. 1382-1382, Dec. 2004.

COOK, P.E.; MCGRAW, E.A. *Wolbachia pipientis*: an expanding bag of tricks to explore for disease control. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 26, n. 8, p. 373-375, Aug. 2010.

COSTA LIMA, A. **Insetos do Brasil**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1943. 141 p.

DOBSON, S.L. Evolution of *Wolbachia* cytoplasmic incompatibility types. **Evolution**, Lancaster, v. 58, n. 10, p. 2156-2166, Oct. 2004.

DURVASULA, R.V.; GUMBS, A.; PANACKAL, A.; KRUGLOV, O.; AKSOY, S.; MERRIFIELD, R.B.; RICHARDS, F.F.; BEARD, C.B. Prevention of insect-borne disease: An approach using transgenic symbiotic bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 7, p. 3274-3278, Apr. 1997.

ESTOUP, A.; BEAUMONT, M.; SENNEDOT, F.; MORITZ, C.; CORNUET, J.M. Genetic analysis of complex demographic scenarios: spatially expanding populations of the cane toad, *Bufo marinus*. **Evolution**, Lancaster, v. 58, n. 9, p. 2021-2036, Sept. 2004.

HARLT, D.H.; CLARCK, A.G. **Princípios de genética de populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 660 p.

HURST, G.D.D.; JIGGINS, F.M.; SCHULENBURG, J.H.G. von der; BERTRAND, D.; WEST, S.A.; GORIACHEVA, I.I.; ZAKHAROV, I.A.; WERREN, J.H.; STOUTHAMER, R.; MAJERUS, M.E.N. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, Washington, v. 266, n. 1420, p. 735-740, Apr. 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acessado em: 28 out. 2010.

JAENIKE, J. Coupled population dynamics of endosymbionts within and between hosts. **Oikos**, Buenos Ayres v. 118, n. 3, p. 353-362, Mar. 2009.

JARNE, P.; THERON, A. Genetic structure in natural populations of flukes and snails: a practical approach and review. **Parasitology**, Cambridge, v. 123, p. 27-40, July 2001.

JOURDIE, V.; ALVAREZ, N.; MOLINA-OCHOA, J.; WILLIAMS, T.; BERGVINSON, D.; BENREY, B.; TURLINGS, T.C.J.; FRANCK, P. Population genetic structure of two primary parasitoids of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera), *Chelonus insularis* and *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera): to what extent is the host plant important? **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, n. 10, p. 2168-2179, May 2010.

KAMBRIS, Z.; BLAGBOROUGH, A.M.; PINTO, S.B.; BLAGROVE, M.S.C.; GODFRAY, H.C.J.; SINDEN, R.E.; SINKINS, S.P. *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits *Plasmodium* development in *Anopheles gambiae*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 10, Oct. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001143>>. Acesso em: 10 ago. 2011.

KLASSON, L.; WALKER, T.; SEBAIHIA, M.; SANDERS, M.J.; QUAIL, M.A.; LORD, A.; SANDERS, S.; EARL, J.; O'NEILL, S.L.; THOMSON, N.; SINKINS, S.P.; PARKHILL, J. Genome evolution of *Wolbachia* strain wPip from the *Culex pipiens* group. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 25, n. 9, p. 1877-1887, Sept. 2008.

LI, T.; ZHANG, M.; QU, Y.H.; REN, Z.M.; ZHANG, J.Z.; GUO, Y.P.; HEONG, K.L.; VILLAREAL, B.; ZHONG, Y.; MA, E. Population genetic structure and phylogeographical pattern of rice grasshopper, *Oxya hyla intricata*, across Southeast Asia. **Genetica**, Dordrecht, v. 139, n. 4, p. 511-524, Apr. 2011.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A.J.; BARBOSA, J.C. Ineffectiveness of pruning to control citrus huanglongbing caused by *Candidatus Liberibacter americanus*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 119, n. 4, p. 463-468, Dec. 2007.

MAYNARD SMITH, J.; SMITH, N.H. Recombination in animal mitochondrial DNA. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 19, n. 12, p. 2330-2332, Dec. 2002

MCMENIMAN, C.J.; LANE, R.V.; CASS, B.N.; FONG, A.W.C.; SIDHU, M.; WANG, Y.F.; O'NEILL, S.L. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. **Science**, Sussex, v. 323, n. 5910, p. 141-144, Jan. 2009.

MEYER, J.M.; HOY, M.A. Molecular survey of endosymbionts in Florida populations of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) and its parasitoids *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) and *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 91, n. 2, p. 294-304, Jan. 2008.

MOORE, W.S. Inferring phylogenies from mtDNA variation – mitochondrial gene trees. **Evolution**, Lancaster, v. 49, n. 4, p. 718-726, Aug. 1995.

MORIN, P.A.; MOORE, J.J.; WOODRUFF, D.S. Identification of chimpanzee subspecies with DNA from hair and allele – specific probes. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, Washington, v. 249, n. 1326, p. 293-297, Sept. 1992.

PINHO, C.; HARRIS, D.J.; FERRAND, N. Comparing patterns of nuclear and mitochondrial divergence in a cryptic species complex: the case of Iberian and North African wall lizards (*Podarcis*, Lacertidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 91, n. 1, p. 121-133, May 2007.

PORRETTA, D.; CANESTRELLI, D.; BELLINI, R.; CELLI, G.; URBANELLI, S. Improving insect pest management through population genetic data: a case study of the mosquito *Ochlerotatus caspius* (Pallas). **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 44, n. 3, p. 682-691, June 2007.

REMAIS, J.V.; XIAO, N.; AKULLIAN, A.; QIU, D.C.; BLAIR, D. Genetic assignment methods for gaining insight into the management of infectious disease by understanding pathogen, vector, and host movement. **Plos Pathogens**, San Francisco, v. 7, n. 4, Apr. 2011. Disponível em:
<<http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1002013>>. Acesso em: 24 maio 2011

ROUSSET, F.; VAUTRIN, D.; SOLIGNAC, M. Molecular identification of *Wolbachia*, the agent of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*, and variation in relation with host mitochondrial types. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, London, v. 247, n. 1320, p. 163-168, Mar. 1992.

RUANG-AREERATE, T.; KITTAYAPONG, P. *Wolbachia* transinfection in *Aedes aegypti*: A potential gene driver of dengue vectors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 33, p. 12534-12539, Aug. 2006.

SECHLER, A.; SCHUENZEL, E.L.; COOKE, P.; DONNUA, S.; THAVEECHAI, N.; POSTNIKOVA, E.; STONE, A.L.; SCHNEIDER, W.L.; DAMSTEEGT, V.D.; SCHAAD, N.W. Cultivation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', '*Ca. L. africanus*', and '*Ca. L. americanus*' Associated with Huanglongbing. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 5, p. 480-486, May 2009.

SEGELBACHER, G.; CUSHMAN, S.A.; EPPERSON, B.K.; FORTIN, M.J.; FRANCOIS, O.; HARDY, O.J.; HOLDEREGGER, R.; TABERLET, P.; WAITS, L.P.; MANEL, S. Applications of landscape genetics in conservation biology: concepts and challenges. **Conservation Genetics**, Amsterdam, v. 11, n. 2, p. 375-385, Apr. 2010.

SKELLEY, L.H.; HOY, M.A. A synchronous rearing method for the Asian citrus psyllid and its parasitoids in quarantine. **Biological Control**, Orlando, v. 29, n. 1, p. 14-23, Jan. 2004.

STOUTHAMER, R. The use of sexual versus asexual wasps in biological control. **Entomophaga**, Paris, v. 38, n. 1, p. 3-6, Mar. 1993.

SUBANDIYAH, S.; NIKOH, N.; TSUYUMU, S.; SOMOWIYARJO, S.; FUKATSU, T. Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera : Psyllidae). **Zoological Science**, Tokyo, v. 17, n. 7, p. 983-989, Sept. 2000.

TEIXEIRA, D.D.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET, J.L.; DA COSTA, P.I.; AYRES, A.J.; BOVE, J. '*Candidatus Liberibacter americanus*', associated with citrus huanglongbing (greening disease) in Sao Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1857-1862, Sept. 2005.

TEIXEIRA, D.D.; DANET, J.L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E.C.; JESUS Jr., W.C.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; BASSANEZI, R.B.; AYRES, A.J.; SAILLARD, C.; BOVE, J.M. Citrus huanglongbing in Sao Paulo State, Brazil: PCR detection of the '*Candidatus*' *Liberibacter* species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 19, n. 3, p. 173-179, June 2005.

WEEKS, A.R.; REYNOLDS, K.T.; HOFFMANN, A.A.; MANN, H. *Wolbachia* dynamics and host effects: what has (and has not) been demonstrated? **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 17, n. 6, p. 257-262, June 2002.

YAMAMOTO, P.T.; FELIPPE, M.R.; SANCHES, A.L.; COELHO, J.H.C.; GARBIM, L.F.; XIMENES, N.L. Eficácia de Inseticidas para o manejo de *Diaphorina citri* kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em citros. **BioAssay**, Londrina, v. 4, n. 4, p. 9, Aug. 2009.

YEN, J.H.; BARR, A.R. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. **Nature**, London, v. 232, n. 5313, p. 657-658, Aug. 1971.

ZABALOU, S.; RIEGLER, M.; THEODORAKOPOULOU, M.; STAUFFER, C.; SAVAKIS, C.; BOURTZIS, K. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 42, p. 15042-15045, Oct. 2004.

ZABALOU, S.; APOSTOLAKI, A.; LIVADARAS, I.; FRANZ, G.; ROBINSON, A.S.; SAVAKIS, C.; BOURTZIS, K. Incompatible insect technique: incompatible males from a *Ceratitidis capitata* genetic sexing strain. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 132, n. 3, p. 232-240, Sept. 2009.

2 DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (HEMIPTERA: PSYLLIDAE)

Resumo

O DNA mitocondrial é utilizado como marcador molecular em diversos estudos evolutivos, incluindo inferência filogenética, identificação da origem de espécies, filogeografia, evolução molecular e análises de dinâmica e estrutura de populações. Ao nível intraespecífico, os padrões filogeográficos se referem à disposição espacial de diferentes populações de uma espécie, visto que as mesmas podem estar organizadas em populações que se comunicam sem nenhuma barreira física ou genética (metapopulação) ou formando pequenos grupos com características próprias (subpopulações). O desenvolvimento dessas subpopulações, dada pela estruturação das populações, tem impacto na variabilidade genética que, na ausência de fluxo gênico, pode levar ao desenvolvimento de populações que passem a apresentar várias características distintas, como preferência hospedeira, eficiência de transmissão de patógenos, suscetibilidade a inimigos naturais e agroquímicos, tolerância a condições abióticas intensas, entre outras mudanças dependentes da interação com o ambiente. Assim, a estruturação populacional tem implicações diretas no desenvolvimento de programas de conservação de espécies ameaçadas de extinção e/ou manejo de espécies pragas. O presente trabalho avaliou a estruturação genética de populações de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae) no estado de São Paulo utilizando parte do gene da citocromo oxidase I (COI) (996 pb) como marcador molecular. As sequências obtidas foram utilizadas para o cálculo dos índices de fixação F , que indicaram a presença de estrutura genética. Cálculos subsequentes com os programas SAMOVA e Arlequin levaram à identificação de três grupos em *D. citri*. Ainda, por meio dos índices de diversidade molecular, foi possível inferir a história demográfica deste inseto no Brasil, havendo a indicação de expansão populacional recente. A indicação de que as populações do Brasil de *D. citri* sejam originárias do centro de origem desta espécie, onde a diversidade haplotípica deve ser maior, permite explicar a existência da expansão recente no país, mesmo após o curto período de tempo após a invasão. Esta hipótese foi avaliada pelo estudo de distância genética entre os haplótipos encontrados e as sequências disponíveis no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), sendo possível considerar que a ou as populações introduzidas no Brasil tenham o sudeste da Ásia como local de origem.

Palavras-chave: DNA mitocondrial; Espécie invasora; Expansão populacional; Genética de populações

Abstract

Mitochondrial DNA is used as a molecular marker in several studies of evolution, including studies of phylogenetic inference, identification of the species origin, phylogeography, molecular evolution and analysis of the population structure and dynamics. At the intraspecific level, the phylogeographic patterns refer to the spatial arrangement of different populations of a species, as populations can be distributed as a single, large population without any physical or genetic barrier (metapopulation) or as small groups with their own particular traits (subpopulations). The development of these subpopulations has an impact on the genetic variability in the absence of gene flow, which can lead to the development of populations with a number of different bioecological characteristics, such as host preference, efficiency in pathogen transmission, susceptibility to natural enemies and pesticides, tolerance to severe abiotic conditions, among other changes based on the interaction with the environment. Thus, the structuration of the population has direct implications in the development of conservation programs for endangered species and/or the management of pest species. This study evaluated the genetic structure of populations of *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae), mainly from the state of Sao Paulo, using a partial (996 bp) of the cytochrome oxidase I gene (*COI*) as a molecular marker. The sequences obtained were used to calculate the fixation index *F*, which indicated the presence of genetic structure. Subsequent calculations using the softwares SAMOVA and Arlequin led to the identification of three groups of populations in *D. citri*. The demographic history of this insect in Brazil was inferred by means of molecular diversity indices, which indicated a recent population expansion. The hypothesis that the Brazilian populations would originate from the center of origin of this species, where the haplotype diversity should be higher, allows to explain the recent population expansion in Brazil even after a short period after invasion. This hypothesis was checked by comparing the similarity of the haplotypes identified in Brazil against those from different areas of the world, which were made available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI). This analysis indicated that the populations found in Brazil are more closely related to populations from Southeast Asia, which is reported to be the center of origin of *D. citri*.

Keywords: Mitochondrial DNA; Invasive species; Population expansion; Population genetics

2.1 Introdução

O DNA mitocondrial tem sido escolhido como marcador molecular para diversos estudos, sendo uma das ferramentas mais comuns em estudos de padrões filogeográficos e variabilidade genética (NORGATE et al., 2009; BROMILOW; SPERLING, 2011; TRIPONEZ et al., 2011).

Ao nível intraespecífico, os padrões filogeográficos se referem à disposição espacial de diferentes populações de uma espécie, visto que as mesmas podem estar organizadas em populações que se comunicam sem nenhuma barreira física ou

genética (metapopulação) ou formando pequenos grupos com características próprias (subpopulações) (HARTL; CLARCK, 2010). O desenvolvimento desses grupos populacionais dado pela estruturação das populações pode levar a alterações na variabilidade genética, visto que as subpopulações podem se tornar geneticamente diferentes na ausência de fluxo gênico. Dessa forma, à medida que ocorre o isolamento genético entre as diferentes populações de uma espécie e as pressões de seleção existentes passam a favorecer fenótipos em particular, aumentam as chances de ocorrer desenvolvimento de populações que passem a apresentar características bioecológicas distintas, como preferência hospedeira, duração do período de acasalamento e desenvolvimento, eficiência de transmissão de patógenos, suscetibilidade a predadores, parasitoides e agroquímicos, tolerância a condições climáticas mais intensas, entre muitas outras mudanças dependentes da interação ambiente – população (CARMICHAEL et al., 2007; PINHO; HARRIS; FERRAND, 2007; JOURDIE et al., 2010; REMAIS et al., 2011). Assim, o desenvolvimento de populações estruturadas tem implicações diretas no desenvolvimento de programas de conservação de espécies ameaçadas de extinção e/ou manejo de espécies pragas (PORRETTA et al., 2007; SEGELBACHER et al., 2010).

Vários fatores ambientais (regiões climáticas distintas, disponibilidade da planta hospedeira, mudanças no comportamento devido às características locais) e genéticos (mutação, seleção, endogamia, efeito fundador, entre muitos outros) podem levar à estruturação de populações (JARNE; THERON, 2001; ESTOUP et al., 2004; AOKI; KATO; MURAKAMI, 2008; LI et al., 2011). No entanto, é evidente que a manutenção da estrutura populacional é dependente do fluxo gênico entre as subpopulações (BOHONAK, 1999), apesar da troca de material genético entre subpopulações não garantir, necessariamente, a homogeneização das mesmas, visto que a pressão de seleção, que pode diferir de local para local, atua de forma antagônica, induzindo a diferenciação entre as populações, levando à fixação ou à perda de alelos nas mesmas. A aquisição de novos alelos por uma população pode ocorrer dado o fluxo gênico ou via mutação. Mutação é um dos principais fatores indutores de variabilidade genética, sendo a seleção o principal fator de manutenção dessas mutações (LOXDALE, 2010).

Sequências mitocondriais também auxiliam na compreensão dos padrões de espécies invasoras, na discussão sobre centro de origem da população invasora e no número de eventos do processo de invasão (LANZAVECCHIA et al., 2008; LOMBAERT et al., 2011; ROLLINS et al., 2011).

O psílídeo *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae), exótico no Brasil, é hoje uma das pragas mais importantes da citricultura mundial por ser vetor das bactérias *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Ca. Liberibacter americanus*, causadoras do “Huanglongbing” (HLB) (BOVÉ, 2006). O HLB foi relatado pela primeira vez no Brasil em 2004, na região de Araraquara (SP), sendo diagnosticada a forma asiática da doença, causada por *Ca. L. asiaticus*, com a posterior descrição de uma nova forma, denominada *Ca. L. americanus* (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005a, 2005b). Seis meses depois já era registrado em mais 46 municípios do estado de São Paulo (BOVÉ, 2006). Nos Estados Unidos, *D. citri* foi detectada em 1998 em Palm Beach, estado da Flórida, em plantas de murta, sendo que em 2001 já tinha se alastrado por 31 municípios da Flórida e atingido o estado do Texas (HALBERT, 2004). Primeiramente relatado em Taiwan em 1907, este inseto encontra-se hoje distribuído em vários países do sul da Ásia, Oriente Médio, América Central, Caribe, América do Sul e sul dos Estados Unidos (HALBERT; MANJUNATH, 2004). No Brasil, *D. citri* é relatada desde a década de 40, mas não recebeu atenção até 2004, quando foram registrados os primeiros sintomas do HLB (TEIXEIRA et al., 2005b).

Apesar de estar distribuída em diversos continentes e ser um problema econômico em vários dos países em que ocorre, muitos de seus aspectos bioecológicos relacionados à genética de populações permanecem indefinidos, como, por exemplo, a sua capacidade de dispersão. Enquanto alguns autores relatam que este psílídeo pode se a distância de 6 metros, dependendo do vento (KOBORI et al., 2011), outros relatam capacidade de movimentação entre áreas distantes de 60 a 100 metros (BOINA et al., 2009a). Ainda, deve se considerar que, por se tratar de um inseto pequeno, este pode ser acidentalmente transportado por caminhões que levam frutos e galhos (HALBERT et al., 2010).

Deste modo, visto a importância de *D. citri* no cenário internacional e nacional, a sua natureza exótica, o desconhecimento da diversidade genética e estrutura das

populações existentes no Brasil, e da história demográfica deste inseto no país, o presente trabalho visa esclarecer a estrutura populacional de *D. citri* no Brasil, além de buscar inferir o local de origem da população invasora, visto que estas informações podem apoiar a tomada de decisões quanto ao manejo dessa espécie e da doença por ela transmitida.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Revisão bibliográfica

2.2.1.2 *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae)

Diaphorina citri Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae) é um inseto exótico, registrado no Brasil desde a década de 40 (COSTA LIMA, 1943). Apesar dos danos diretos que pode causar, só recebeu atenção como praga em 2004, quando foi confirmada a doença “Huanglongbing” (HLB) em citros (TEIXEIRA et al., 2005b), a qual foi posteriormente relacionada a *D. citri* como inseto – vetor (YAMAMOTO et al., 2009).

O continente asiático é relatado como o provável centro de origem de *D. citri*, mas esse inseto se distribui pelas regiões Paleárticas, Afrotropical, Oriental e Neotropical (AUBERT, 1987). Os hospedeiros naturais de *D. citri* são plantas da família Rutaceae, principalmente dos gêneros *Citrus* e *Murraya*. No entanto, não são em todas as plantas dessa família que este psilideo é capaz de completar seu desenvolvimento, sendo *Citrus sinensis*, *C. limonia*, *C. jambhiri*, *C. aurantium*, *C. paradisi* e *Murraya paniculata* os hospedeiros de melhor qualidade (TSAI; LIU, 2000; HALL, 2008; NAVA et al., 2010).

D. citri está geralmente associada a ramos novos, colocando seus ovos em brotações, sendo a presença de brotos nas plantas o principal fator para sua ocorrência e crescimento populacional (YAMAMOTO; PAIVA; GRAVENA, 2001). Os ovos apresentam um pedúnculo oco que é inserido na planta. O período de ninfa contém cinco ínstares, no qual as ninfas apresentam comportamento gregário e excretam “honeydew”. Nos primeiros instares, as ninfas não se locomovem a menos que sejam perturbadas, sendo mais ativas no 5º ínstar (TSAI; LIU, 2000; HALL, 2008).

Os adultos, também de caráter gregário, não voam bem, apresentando capacidade de dispersão em torno de 6 m, podendo alcançar até 12 m de distância com

auxílio do vento (KOBORI et al., 2011). No entanto, Boina e colaboradores (2009a) relataram a movimentação entre áreas com práticas de manejo e áreas abandonadas que se distanciavam de 60 a 100 m, indicando a possibilidade de uma maior capacidade de movimentação nesse inseto. Ainda, cabe ressaltar que por ser um inseto pequeno, *D. citri* pode ser levada por caminhões de fruta *in natura*, movendo-se por quilômetros (HALBERT et al., 2010).

Em condições tropicais, várias gerações de psíldeos podem ser observadas ao longo do ano. Em geral, as maiores densidades de adultos são observadas no final da primavera e início do verão, quando ramos novos são abundantes nas plantas. De fato, os principais fatores ecológicos que influenciam o desenvolvimento desse inseto em citros são os fluxos vegetativos e a temperatura (YAMAMOTO; PAIVA; GRAVENA, 2001). Desse modo, foram observados três picos populacionais anuais na China, um na primavera, outro no verão e o terceiro no outono, coincidindo com a emissão de ramos novos (YANG et al., 2006).

D. citri induz danos diretos pequenos quando comparados à seriedade do HLB. Os danos diretos são causados pela sucção de seiva, injeção de toxinas e picadas sucessivas que induzem o enrolamento de folhas e o retorcimento de brotos. Em infestações intensas, os ramos secam. Indiretamente, favorecem o desenvolvimento da fumagina e atraem formigas devido ao líquido açucarado que expelem (SKELLEY; HOY, 2004).

O HLB é uma doença fatal aos citros (BOVÉ, 2006). No Brasil foram relatadas duas formas da bactéria causadora desta doença, a asiática, *Ca. Liberibacter asiaticus*, detectada inicialmente em São Paulo, juntamente com uma nova forma, a americana, *Ca. Liberibacter americanus* (COLETTA-FILHO et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2005a).

Atualmente, não há cura para plantas doentes. Portanto, o manejo do HLB é baseado no controle do psíldeo e na retirada de árvores infectadas visando à diminuição da disseminação da doença (LOPES et al., 2007). Desta forma, os programas atuais de manejo de *D. citri* incluem o controle biológico clássico, utilizando o ectoparasitoide *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) (SHELLEY; HOY, 2004), os predadores naturais (MICHAUD; OLSEN, 2004), fungos

entomopatogênicos (HOY; SINGH; ROGERS, 2010) e o controle químico (BOINA et al., 2009b; YAMAMOTO et al., 2009; QURESHI; STANSLY, 2010; ICHINOSE et al., 2010).

2.2.1.2 Genética de populações

A genética de populações trata das leis de Mendel e de outros princípios genéticos que resultam em mudanças evolutivas nas espécies ao longo do tempo. População, neste contexto, se refere a um grupo de organismos da mesma espécie vivendo em uma área geográfica restrita o suficiente para que ocorram cruzamentos aleatórios (HARLT; CLARK, 2010).

A definição precisa da unidade populacional é difícil, pois normalmente existe a presença de uma estrutura geográfica em espécies, ou seja, um padrão de distribuição não-aleatório. Esta estrutura, chamada de populações locais ou demes, é fundamental na genética de populações porque é dentro dela que a evolução adaptativa acontece por meio da mudança nas frequências alélicas. Essas mudanças ocorrem porque os demes ficam totalmente ou parcialmente isolados entre si, permitindo que forças diferentes atuem sobre cada subpopulação (HARLT; CLARK, 2010).

A estrutura populacional de uma espécie é facilmente observada quando é delimitada por uma barreira física, ou seja, por fatores demográficos; porém, fatores comportamentais, biológicos e genéticos podem formar grupos e estruturar populações em subpopulações. Entre estes fatores se destacam as diferenças entre os sexos, a idade, ou estádios de desenvolvimento, os tipos de seleção, a endogamia, a deriva genética, o tamanho efetivo, o padrão de fluxo gênico e a presença de alelos deletérios mantidos na população por mutações recorrentes (CHARLESWORTH; CHARLESWORTH; BARTON, 2003). Todos esses fatores afetam diretamente a variabilidade genética e como esta é mantida ao longo das gerações nos diversos demes (HARLT; CLARK, 2010).

Um dos processos mais simples que causa variabilidade genética é a deriva genética aleatória, a qual se baseia na premissa de que somente o acaso altera as frequências genéticas. No entanto, vários outros processos podem gerar variação genética, como mutação, recombinação, migração e seleção. Contudo, a principal causa de variabilidade é a mutação, pois reflete a mudança na sequência nucleotídica e, conseqüentemente, em alterações das frequências alélicas. Os outros processos

geradores de variabilidade genética são associados às mutações, visto que a recombinação une em um cromossomo mutações que ocorreram em genes diferentes. Já a migração permite que as mutações se misturem e espalhem entre os demes. Ainda, essas mutações podem estar localizadas em um gene sob seleção, o que pode levar à fixação ou eliminação do alelo mutante na população (LOXDALE, 2010).

Na ausência de pressão de seleção, as mutações introduzem novos alelos na população, sendo que a deriva genética aleatória determina se este alelo neutro será fixado ou perdido. Alelos neutros refletem a Teoria Neutra, a qual prediz que os polimorfismos genéticos resultam de alelos seletivamente neutros, mantidos por um balanço entre os efeitos de mutação e deriva genética aleatória (KIMURA, 1969). A hipótese dos alelos neutros afirma que muitas mutações não têm efeito sobre a sobrevivência ou reprodução dos indivíduos. Assim, do ponto de vista da biologia evolutiva, não seria muito significativo; porém, para genética de populações, o fato de alelos neutros serem “invisíveis” ao processo de seleção natural os torna ótimos indicadores de estrutura populacional (KIMURA, 1969; HARLT; CLARK, 2010).

Assim, estudos de genética populacional podem ser divididos em duas partes, que envolvem i) definir a estrutura populacional e ii) explicar a história demográfica que gerou essa estrutura. Para isto, uma série de modelos e cálculos foi desenvolvida para compreender os mecanismos que geram variabilidade genética. A existência de estrutura populacional é normalmente definida pelo índice de fixação, um indicador de diferenciação genética que permite a comparação objetiva do efeito geral da estrutura populacional em diferentes organismos. Definido por Wright (1921), o índice de fixação (F) uniformiza a redução na heterozigosidade esperada com o cruzamento aleatório em qualquer nível populacional. O símbolo genérico para o índice (F) é acrescido de subscritos que denotam os níveis hierárquicos, sendo F_{ST} a medida mais inclusiva da subdivisão populacional, pois compara a diferenciação entre populações em relação à variação intrapopulacional (WRIGHT, 1950). Essa estatística tem limitações, o que fez com que algumas outras medidas relativas ao F_{ST} fossem desenvolvidas, dependendo do método inicial utilizado, como G_{ST} (NEI, 1964) e θ (WEIR; COCKERHAM, 1984). No entanto, essas medidas são matematicamente mais complexas e apresentam restrições

quanto ao método analítico utilizado. O G_{ST} , por exemplo, é melhor empregado com dados de análises de microssatélites (PEARSE; CRANDALL, 2004).

As estatísticas F são análises padrões em genética de populações, além de servirem às estimativas de migração (NEIGEL, 2002; WEIR; HILL, 2002). As taxas de migração estimadas por meio de dados genéticos são diferentes daquelas obtidas em experimentos de captura e recaptura, visto que em experimentos de campo é possível observar a movimentação e as informações ecológicas que os dados genéticos não mostram. Os dados genéticos resultam em uma taxa média que representa o sucesso de migração, ou seja, migrantes que se reproduzem. A medida mais utilizada para taxa de migração é derivada do F_{ST} e representa uma média da migração entre os demes (PEARSE; CRANDALL, 2004). No entanto, este parâmetro tem muitas limitações e contradições, como, por exemplo, o fato de que o F_{ST} não distingue entre casos em que ocorreu alta migração entre populações com um longo tempo de divergência, daqueles com história comum recente em que não houve fluxo gênico (SLATKIN, 1989; BOSSART; PROWELL, 1998).

Testes estatísticos também foram elaborados para testar desvios da neutralidade, sendo o teste D de Tajima um dos mais utilizados. Esse teste se baseia no modelo de alelos infinitos, sendo que valores positivos podem indicar mistura recente entre duas populações diferentes, enquanto valores negativos são resultantes de uma expansão recente (TAJIMA, 1983). Outro teste é o F de aderência à coalescência neutra de Fu e Li de. Este teste se baseia nas árvores de coalescência para verificar se o padrão de polimorfismo é consistente com o modelo neutro de sítios infinitos em equilíbrio dinâmico (FU; LI, 1993). Aqui cabe uma ressalva quanto ao termo coalescência, o qual se refere ao processo ao qual, olhando para o tempo, as genealogias de dois alelos se unem em um ancestral comum. A ideia da análise de coalescência é considerar a história evolutiva do gene ancestral por meio de modelos para os intervalos de tempo entre cada evento de coalescência (KINGMAN, 2000; ROSENBERG; NORDORG, 2002). Assim, em árvores filogenéticas, uma população em expansão terá ramos curtos e a coalescência ocorrerá próximo a raiz, sendo a mesma denominada de filogenia em forma de estrela (HARLT; CLARCK, 2010). O padrão de

ramificação de árvores de coalescência também pode indicar padrões históricos de crescimento populacional (EMERSON; PARADIS; THEBAUD, 2001).

No entanto, é necessário compreender que a estrutura populacional não é fixa, e como cada deme se comporta frente à diversidade genética faz parte da história demográfica da população. Por exemplo, a estrutura populacional pode sofrer flutuações que reduzem a variabilidade genética, como é o caso do efeito gargalo ou de uma mudança seletiva apoiada em uma mutação benéfica. Ainda, a estabilidade da estrutura populacional está relacionada à manutenção da variabilidade genética por meio da migração. O fluxo gênico determina quanto um deme pode ser diferente geneticamente (SLATKIN, 1987), visto que possibilita a disseminação de novos genes que podem conferir benefícios às populações que recebem fluxos de indivíduos migrantes. O fluxo gênico estando ausente, pode, ao longo do tempo, conduzir à especiação (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004).

Trazer toda essa problemática para ser estudada em laboratório fez com muitas técnicas fossem desenvolvidas e aprimoradas em um curto espaço de tempo, com a revolução genômica gerando uma quantidade infindável de dados (AVISE, 2010). Inicialmente, esses estudos contavam com as técnicas de eletroforese de aloenzimas e outros métodos que indicavam variação proteica (KNERR et al., 1989; BARNABÉ; BRISSE; TIBAYRENC, 2000). Contudo, apesar desse método ser conveniente para detectar polimorfismo, a extrapolação dos resultados para a investigação da variação genômica é limitada, dada a degenerancia do uso de codons (BEHURA, 2006). Deste modo, outras abordagens foram desenvolvidas com base no polimorfismo da sequência de DNA, tais como enzimas de restrição, hibridização DNA/DNA, RAPD ("Random Amplification of Polymorphic DNA"), AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism"), microssatélite, análise do DNA mitocondrial, entre outras técnicas que são constantemente aprimoradas ou desenvolvidas (AVISE, 2010).

Desde a década de 70, as análises de DNA mitocondrial (mDNA) passaram a fazer parte da maioria dos estudos filogenéticos e evolutivos de vários organismos, pois o mDNA apresenta características genéticas e estruturais únicas (HARRISON, 1989, MORITZ, 1994). Entre elas a rápida taxa de mutação (BROWN et al, 1982), a ausência de recombinação (MAYNARD; SMITH; SMITH, 2002), a herança materna (BIRKY,

1991), a estrutura genética simples e o reduzido tamanho populacional efetivo (AVISE et al., 1987; MOORE, 1995). As facilidades técnicas que permitem trabalhar com amostras de museus e com quantidades mínimas de material ainda favorecem esta técnica (ROY et al., 1994). Essas características permitem o uso do mDNA como marcador molecular em diversos estudos evolutivos, incluindo inferência filogenética, identificação da origem de espécies, filogeografia, evolução molecular e análises de dinâmica e estrutura de populações (SIMON et al., 1994; ZHANG; HEWITT, 1997; BOORE, 1999; BARNABÉ; BRISSE; TIBAYRENC, 2000; SHAO; BARKER, 2007).

O DNA mitocondrial é uma molécula circular na faixa de 15 a 20 Kb com 37 genes, dos quais 24 codificam para proteínas responsáveis pela replicação da molécula de DNA mitocondrial e 13 por proteínas ligadas à cadeia de transporte de elétrons (BALLARD; WHITLOCK, 2004). Existe também uma região não codificadora conhecida como alça-D (“D-loop”), em vertebrados e equinodermatas, ou região rica em A+T, em invertebrados, responsável pela origem de replicação e transcrição da molécula do mDNA. Essa região apresenta variação em tamanho, sendo utilizada como indicador de polimorfismo ao nível intraespecífico (BALLARD; WHITLOCK, 2004).

Na área de genética de populações e filogeografia, o DNA mitocondrial é geralmente utilizado para i) desvendar padrões filogeográficos que podem ter sofrido alteração devido às mudanças climáticas (NORGATE et al., 2009; BROMILOW; SPERLING, 2011; TRIPONEZ et al., 2011), ii) testar a perda da variabilidade genética, iii) esclarecer padrões populacionais históricos (GASPERI et al., 2002), iv) verificar mudanças dramáticas no tamanho populacional (KATO; MURAKAMI, 2008), v) avaliar a conectividade entre demes e vi) descobrir a origem de indivíduos migrantes (STRASBURG; RIESEBERG, 2011).

A taxonomia e a sistemática são áreas que também se beneficiam da utilização do DNA mitocondrial como ferramenta de estudo, visto que uma porção deste marcador molecular foi proposta para a identificação de espécies, levando à criação de um código de barras molecular (“DNA barcoding”). Apesar da aplicação do “DNA barcoding” ainda ser motivo de controvérsias (HERBET; GREGORY, 2005; BURNS et al., 2007; MILLER, 2007; SONG et al., 2008), é inegável a aplicação do DNA mitocondrial na definição de limites entre espécies (LINTON et al., 2002), descoberta de espécies crípticas

(SCHLICK-STEINER et al., 2006; CHEN; HARES, 2011) e determinação da origem de espécies invasoras (COLLET et al., 2006; HAVILL et al., 2006; HURLEY et al., 2010; ROLLINS et al., 2011).

Ainda, os estudos com DNA mitocondrial podem e devem ser visto em abordagens práticas, como observado na entomologia forense (PICARD; WELLS, 2010) e na área de manejo e conservação, pois a correta interpretação dos dados permite definir a escala geográfica de conservação da biodiversidade (KROSCH et al., 2011) e do manejo de insetos vetores (REMAIS et al., 2011), por exemplo.

2.2.2 Material e métodos

2.2.2.1 Locais de coleta

Amostras de *D. citri* foram coletadas em diferentes localidades, principalmente do estado de São Paulo (Tabela 2.1). As amostras consistiram de subamostragens de psilídeos em brotações novas de diversas plantas de citros ou murta. Os espécimes foram imediatamente fixados em 100% etanol para posterior extração do DNA genômico (gDNA).

2.2.2.2 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando-se o número máximo de indivíduos obtidos por local de coleta (5 a 10 – ver Tabela 2.1). Os espécimes foram removidos do etanol, colocados no interior de tubos de 1,5 ml e mantidos à temperatura ambiente para a completa evaporação do etanol. Após a secagem, foram adicionados 100 µl do tampão de extração TEN (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA, pH 8,0; 400 mM NaCl), acrescidos de 40 µl SDS a 20% e 8 µl de proteinase-K a 20 mg/ml. O material foi macerado com auxílio de pistilo e incubado a 55°C por 1 h. Após este período, 300 µl de solução aquosa saturada de cloreto de sódio (5 M NaCl) foram adicionados, a amostra foi agitada vigorosamente em vortex por 30 s, centrifugada a 14.000 g (30 min a 25°C), e o sobrenadante coletado. Um volume de isopropanol gelado foi adicionado ao sobrenadante e incubado a -20°C por 1 h para a precipitação do DNA. O material foi então centrifugado (14.000 g x 20 min a 4°C), o sobrenadante descartado e o pellet de DNA lavado em banhos sucessivos de 100% (1x) e 70% (2x)

etanol e centrifugado a 14.000 g por 10 min a 4°C. Ao término das lavagens, o pellet de DNA foi mantido à temperatura ambiente para completa evaporação do etanol, sendo posteriormente ressuspenso em 20 µl de água Milli-Q autoclavada e armazenado a -20°C até sua utilização. A integridade do DNA extraído foi avaliada via eletroforese em gel de agarose a 1% acrescido de 0,5 µg/ml de brometo de etídio, em tampão tris-acetato-EDTA (TAE) (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA; pH 7,2) a 5 V/cm e posterior visualização em transiluminador (SUNNUCKS; HALES, 1996).

Tabela 2.1 – Dados referentes às localidades, data de coleta, coletor, planta hospedeira e número de indivíduos (N) de *Diaphorina citri* coletados/localidade

(continua)

Local	Latitude	Longitude	Data	Planta	Coletor	N
Brasil - MG						
Divinópolis	20°08'20"S	44°53'02"W	31.x.2010	Citros	A.J.F. Diniz	9
Brasil - MS						
Três Lagoas	20°45'04"S	51°40'42"W	31.i.2010	Murta	R.H. Silva	5
Brasil – PR						
Maringá	23°25'31"S	51°56'19"W	20.iv.2009	Citros	F.C.A. Dossi	10
Brasil - SP						
Araraquara	21°47'40"S	48°10'32"W	01.iii.2005	Murta	Fundecitrus	10
Bandeirantes D' Oeste	20°36'33"S	50°48'36"W	23.x.2008	Murta	A. Lahoz	10
Barretos	20°33'26"S	48°34'04"W	27.x.2009	Murta	M. Miranda	9
Bebedouro	20°56'58"S	48°28'45"W	20.viii.2010	Murta	A.S. Poltronieri	10
Botucatu	22°53'09"S	48°26'42"W	01.iii.2005	Citros	Fundecitrus	5
Cafelândia	21°48'09"S	49°36'36"W	01.iii.2005	Citros	Fundecitrus	5
Cardoso	20°04'55"S	49°54'51"W	28.x.2009	Murta	M. Miranda	10
Casa Branca	21°46'26"S	47°05'11"W	01.iii.2005	Citros	Fundecitrus	5
Cerqueira César	23°02'08"S	49°09'58"W	10.x.2008	Citros	A. Lahoz	10
Espírito Santo do Turvo	22°41'32"S	49°25'49"W	15.ix.2008	Citros	A. Lahoz	10
Guarantã	21°53'42"S	49°35'23"W	01.iii.2005	Citros	Fundecitrus	5
Itapetininga	23°35'30"S	48°03'11"W	01xii.2008	Citros	A. Lahoz	10
Itirapina	22°15'10"S	47°49'22"W	01.iii.2005	Citros	Fundecitrus	5
Mogi Mirim	22°25'55"S	46°57'28"W	21.viii.2010	Murta	A.S. Poltronieri	10
Monte Alto	21°15'40"S	48°29'47"W	17.x.2009	Murta	M. Miranda	10
Nova Granada	20°32'02"S	49°18'51"W	23.xi.2009	Citros	R.A. Thomazini	10
Novo Horizonte	21°28'05"S	49°13'15"W	05.xi.2009	Citros	M. Miranda	10
Palestina	20°23'24"S	49°25'59"W	11.xii.2009	Murta	R.A. Thomazini	10

Tabela 2.1 – Dados referentes às localidades, data de coleta, coletor, planta hospedeira e número de indivíduos (N) de *Diaphorina citri* coletados/localidade

(conclusão)

Local	Latitude	Longitude	Data	Planta	Coletor	N
Palmeira D'Oeste	20°24'59"S	50°45'43"W	07.x.2009	Murta	M. Miranda	10
Penápolis	21°25'11"S	50°04'39"W	02.xii.2009	Murta	Fundecitrus	10
Piracicaba	22°43'31"S	47°38'57"W	19.xi.2008	Murta	A.S. Guidolin	10
Pongai	21°44'11"S	49°22'00"W	01.iii.2005	Citros	Fundecitrus	5
Potirendaba	21°02'34"S	49°22'38"W	01.xii.2009	Murta	R.A. Thomazini	10
Regianópolis	21°53'17"S	49°13'31"W	26.ix.2008	Citros	A. Lahoz	10
Ribeirão Preto	21°10'39"S	47°48'37"W	24.xii.2008	Murta	F.L. Cônsoli	10
Sales	24°01'00"S	47°54'00"W	22.x.2009	Citros	M. Miranda	8
Santa Cruz da Conceição	22°08'25"S	47°27'07"W	02.xii.2009	Citros	Fundecitrus	10
Santa Fé do Sul	20°12'40"S	50°55'33"W	01.iii.2005	Citros	Fundecitrus	10
São Carlos	22°01'03"S	47°53'27"W	01.iii.2005	Citros	Fundecitrus	5
Sud Mennucci	20°37'06"S	50°52'48"W	23.x.2008	Murta	A. Lahoz	10
Três Fronteiras	20°14'06"S	50°53'25"W	16.x.2009	Murta	M. Miranda	10
Urupês	21°12'06"S	49°17'24"W	21.x.2009	Citros	M. Miranda	10
Brasil – RR Boa Vista	2°49'11"N	60°40'24"W	19.vi.2009	Murta	A. Massapo	10
Uruguai Inia/ Campoll	31°23'0"S	57°58'00"W	29.xii.2010	Citros	L. Rubio	10

2.2.2.3 Amplificação e sequenciamento do gene da citocromo oxidase I

As análises de variabilidade genética intra e interpoblacional das diversas amostras de *D. citri* foram realizadas utilizando-se o gene mitocondrial da citocromo oxidase I (*COI*) como marcador molecular. A sequência do gene da *COI* de *D. citri* foi obtida utilizando-se os iniciadores DcCOIFagdeg (5'-CAATTGTAACWGCWCAYGCT-3'), DcCOIFag (5'-CAATTGTAAGTGCACACGCT-3'), DcCOIR-ag (5'-GCTCGTGAGTCTACATCTAT-3'), DcitriCOIL (5'-AGGAGGTGGAGACCCAATCT-3') e DcitriCOIr (5'-TCAATTGGGGGAGAGTTTTG-3') em reações independentes de amplificação, todas programadas a 92°C por 5 min (1 ciclo), 35 ciclos a 92°C por 1 min, 53°C por 1 min e 72°C por 1,5 min e extensão final a 70°C por 10 min. As reações foram feitas em volume total de 25 µl, contendo 1-10 ng de gDNA, 1x PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,32 µMol de cada iniciador e 0,5 U de Taq

polimerase. Os iniciadores DcCOIFagdeg, DcCOIFag e DcCOIRag foram utilizados na amplificação da porção 5' do gene da *COI* de *D. citri*, enquanto os iniciadores DcitriCOIL e DcitriCOIr foram utilizados na amplificação da porção 3'. A sequência final do gene da *COI* utilizada neste estudo foi obtida da junção dos dois produtos de PCR originados de reações independentes de PCR após sobreposição de regiões idênticas.

Os produtos de amplificação foram visualizados em transiluminador após eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio, em tampão 1x TAE. Amplicons de tamanho esperado foram purificados com o método enzimático ExoSap (Fermentas), adicionando-se 10 U da enzima *ExoI*, 1 U da enzima *Sap* a 5 µl do produto de PCR. As amostras foram mantidas a 37°C por 15 min e posteriormente submetidas a 80°C por 15 min para inativação das enzimas. Os produtos de purificação foram visualizados em transiluminador UV após eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio em tampão 1x TAE, e quantificados por comparação de intensidade de banda com as bandas do marcador "Low mass" (Invitrogen). As amostras purificadas foram então enviadas para sequenciamento bidirecional no "Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética" (CEBMG), UNICAMP.

2.2.2.4 Diversidade genética de *Diaphorina citri*

As sequências obtidas foram visualizadas no programa FinchTV v.1.4.0 (Geospiza Inc.) e montadas com auxílio da ferramenta BLAST. As sequências completas foram alinhadas com a ferramenta ClustalW disponível no programa Mega 5.05, utilizando os parâmetros padrão (penalidade de "gap" = 15, extensão de "gap" = 9) (TAMURA et al., 2011).

As análises de variabilidade genética intra e interpopulacional das diversas amostras de *D. citri* foram realizadas utilizando-se 996 pares de bases do gene mitocondrial da citocromo oxidase I. Os haplótipos foram definidos com auxílio do programa TCS v.1.21 (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000), assim como a frequência de cada haplótipo. A rede haplotípica gerada por este mesmo programa foi editada segundo Crandall e Templeton (1993).

A distribuição espacial dos haplótipos foi visualizada com auxílio do programa ArcGis v9.3, no qual foram plotados os dados de longitude e latitude de cada localidade, obtidos no software on-line www.geonames.org, contra a matriz de haplótipo por população. A formação de grupos de haplótipos foi verificada com o programa SAMOVA 1.0 (DUPANLOUP; SCHNEIDER; EXCOFFIER, 2002), que se baseia nas estatísticas F de Wright somente com as amostras do estado de São Paulo, sendo os resultados obtidos empregados na análise molecular de variância (AMOVA) hierárquica, realizada no programa Arlequin v.3.5.1.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010).

A ocorrência de estruturação genética e a história demográfica das populações de *D. citri* também foram analisadas com o programa Arlequin v 3.5.1.2, calculando-se as diversidades haplotípica (H) e nucleotídica (π), os valores de theta (Θ), os testes de neutralidade D de Tajima e F de Fu, a AMOVA e a distribuição par a par (“mismatch distribution”), a qual gera valores de soma dos desvios quadrados (SSD) e o índice de Raggedness, que são utilizados para verificar o ajuste ao modelo de expansão populacional.

2.2.2.5 Análises bayesianas

A dinâmica populacional histórica de *D. citri* foi investigada via “Bayesian skyline plots” (BSP) (DRUMMOND et al., 2005), com auxílio do programa Beast 1.6.1 (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007). Este método permite estimar o tamanho efetivo das populações ao longo do tempo e não requer um modelo demográfico *a priori*. As genealogias e os parâmetros do modelo estimados nesta análise foram amostrados a cada 8.000 iterações em corridas de 80 milhões de gerações com 10% das amostras iniciais descartadas como aquecimento das cadeias (“burn-in”).

2.2.2.6 Origem de *Diaphorina citri* introduzida no Brasil

Sequências parciais do gene da citocromo oxidase I de populações de *D. citri* de várias localidades do mundo foram recuperadas do banco de dados do NCBI (ANEXO A). Estas sequências foram alinhadas por população e uma sequência distinta de cada localidade foi selecionada para posterior alinhamento com as sequências haplotípicas geradas neste trabalho junto ao programa Mega 5.05 com os parâmetros-padrão

(penalidade de “gap” = 15, extensão de “gap” = 9). As relações filogenéticas entre as populações foram averiguadas por análise de Neighbor-joining com 1.000 repetições utilizando o modelo de distância p no programa Mega 5.05.

2.2.3 Resultados

As análises populacionais utilizaram 202 sequências referentes aos diversos locais de coleta com a amplificação de 996 bases do gene que codifica para a citocromo oxidase I, sendo encontrados 46 sítios variáveis e uma distância genética média pelo modelo de distância p de 0,003. Deste modo definiu-se 53 haplótipos, sendo 36 deles de ocorrência única (Tabela 2.2).

Esses haplótipos formam uma rede complexa e bastante interligada, a qual mais de um haplótipo apresenta frequência alta, como os haplótipos Hap1, Hap2 e Hap3, que contem respectivamente 71, 29 e 13 sequências. Os dois haplótipos mais frequentes – Hap1 e Hap2 - tem forma de estrela, apesar do Hap1 estar mais relacionado com os haplótipos únicos, enquanto que aqueles ligados ao Hap2 dão origem a outras conexões. Ainda, esses dois haplótipos se conectam por um (1) passo mutacional que resulta na mudança de um (1) aminoácido, e por conexões intermediárias que dão origem a outros haplótipos com múltiplas ocorrências. Ressalta-se que a rede apresenta muitas mutações não sinônimas, representadas pelas linhas grossas, ou seja, muita da variação nucleotídica pode ser refletida no fenótipo, visto que há mudança no perfil de aminoácidos (Figura 2.1). Neste ponto, as sequências trabalhadas codificam para 331 aminoácidos, ocorrendo 26 sítios polimórficos, resultando em 38 tipos proteicos.

A distribuição geográfica dos haplótipos indicou a existência de dois grupos, aqui denominados como i) grupo amarelo, por apresentarem populações em que predominam o haplótipo 2, e ii) grupo vermelho, por apresentarem populações com predominância do haplótipo 1 (Figura 2.2).

Tabela 2.2 – Denominação e frequência de haplótipos encontrados em diferentes populações de *Diaphorina citri* no Brasil

(continua)

Locais de coleta	Haplótipo (número de indivíduos)
Brasil – MG Divinópolis	Hap2(1), Hap4(1)
Brasil – MS Três Lagoas	Hap2(2), Hap10(1)
Brasil – PR Maringá	Hap2(2), Hap4(1), Hap32(1)
Brasil –SP	
Araraquara	Hap1(5), Hap13(1), Hap22(1)
Bandeirantes D'Oeste	Hap2(2), Hap6(1), Hap24(1)
Barretos	Hap1(3), Hap2(1), Hap7(1), Hap11(2), Hap25(1)
Bebedouro	Hap1(1)
Botucatu	Hap3(2), Hap5(2)
Cafelândia	Hap1(3), Hap5(1), Hap50(1)
Cardoso	Hap2(2), Hap4(1), Hap7(2), Hap8(1), Hap31(1)
Casa Branca	Hap1(2), Hap17(1), Hap41(1)
Cerqueira César	Hap1(3), Hap2(1), Hap18(1), Hap19(1)
Espírito Santo do Turvo	Hap1(4), Hap2(1), Hap12(1), Hap20(1), Hap39(1) Hap48(1)
Guarantã	Hap1(1), Hap29(1), Hap33(1), Hap36(1), Hap43(1)
Itapetininga	Hap1(5), Hap5(1), Hap45(1)
Itirapina	Hap3(1), Hap13(1)
Mogi Mirim	Hap1(1), Hap30(1), Hap37(1), Hap38(1), Hap42(1)
Monte Alto	Hap1(1), Hap3(1), Hap9(1), Hap15(1)
Nova Granada	Hap1(1), Hap3(2), Hap26(1), Hap28(1), Hap40(1), Hap44(1)
Novo Horizonte	Hap1(1), Hap3(2), Hap7(1), Hap10(1), Hap53(1)
Palestina	Hap2(1), Hap4(2), Hap6(2), Hap8(1), Hap14(1), Hap15(1)
Palmeira D'Oeste	Hap1(1), Hap2(6), Hap6(1)
Penápolis	Hap6(1), Hap7(1), Hap9(1), Hap10(1), Hap16(2), Hap34(1) Hap47(1), Hap51(1)
Piracicaba	Hap1(3), Hap9(1), Hap11(1)
Pongái	Hap46(1), Hap52(1)
Potirendaba	Hap3(2), Hap17(1), Hap41(1), Hap49(1)
Regianópolis	Hap1(5), Hap2(1)
Riberão Preto	Hap1(6)

Tabela 2.2 – Denominação e frequência de haplótipos encontrados em diferentes populações de *Diaphorina citri* no Brasil

(conclusão)

Locais de coleta	Haplótipo (número de indivíduos)
Sales	Hap6(1), Hap21(1), Hap35(1)
Santa Cruz da Conceição	Hap1(1), Hap3(2), Hap4(1), Hap5(1), Hap9(1)
Santa Fé do Sul	Hap2(6), Hap8(1), Hap23(1)
São Carlos	Hap1(5)
Sud Mennucci	Hap2(1), Hap4(1), Hap5(2), Hap8(1)
Três Fronteiras	Hap2(1), Hap3(1), Hap10(1), Hap14(1)
Urupês	Hap1(6), Hap2(1)
Brasil – RR	
Boa Vista	Hap1(7), Hap27(1)
Uruguai	
Inia/Campoll	Hap1(6)

Figura 2.1 – Rede de haplótipos de *Diaphorina citri* amostrados em diversas populações do Brasil, gerada no programa TCS a partir de sequencias parciais de citocromo oxidase I (996 bases). Linhas finas representam mutações sinônimas, enquanto as grossas indicam mutações não-sinônimas. Círculos de coloração cinza representam haplótipos únicos

Figura 2.2 - Distribuição geográfica dos haplótipos de *Diaphorina citri* identificados nas populações analisadas. Localidades: Minas Gerais: 1 - Divinópolis; Mato Grosso do Sul: 2 - Três Lagoas; Paraná: 3 - Maringá; São Paulo: 4 - Araraquara, 5 - Bandeirantes D'Oeste, 6 - Barretos, 7 - Bebedouro, 8 - Urupês, 9 - Botucatu, 10 - Cafelândia, 11 - Cardoso, 12 - Casa Branca, 13 - Cerqueira César, 14 - Espírito Santo do Turvo, 15 - Guarantã, 16 - Itapetininga, 17 - Itirapina, 18 - Mogi Mirim, 19 - Monte Alto, 20 - Nova Granada, 21 - Novo Horizonte, 22 - Palestina, 23 - Palmeira D'Oeste, 24 - Penápolis, 25 - Piracicaba, 26 - Pongái, 27 - Potirendaba, 28 - Regianópolis, 29 - Riberão Preto, 30 - Sales, 31 - Santa Cruz da Conceição, 32 - Santa Fé do Sul, 33 - São Carlos, 34 - Sud Mennucci, 35 - Três Fronteiras; Roraima: 36 - Boa Vista

Contudo, análises estatísticas permitiram a identificação de três grupos geneticamente homogêneos e geograficamente isolados de *D. citri*, sendo que neste trabalho foram estabelecidos três grupos dentro do estado de São Paulo (Tabela 2.3). Associando os grupos do SAMOVA com a distribuição geográfica ilustrada (Figura 2.2), foi definido que o grupo 1 é representado pela cor amarela devido à predominância do Hap2, o grupo 2 pela cor cinza, por apresentar populações que predominam haplótipos únicos, e o grupo 3 pela cor vermelha, dada a predominância do Hap1.

Tabela 2.3 - Grupos geneticamente homogêneos e geograficamente isolados de *Diaphorina citri* definidos a partir do programa SAMOVA 1.0

Grupos	Locais de Coleta
Grupo 1	Bandeirantes D'Oeste, Palmeira D'Oeste, Santa Fé do Sul e Três Fronteiras
Grupo 2	Cardoso, Palestina, Penápolis e Sud Mennucci
Grupo 3	Araraquara, Barretos, Bebedouro, Botucatu, Cafelândia, Casa Branca, Cerqueira César, Espírito Santo do Turvo, Guarantã, Itapetininga, Mogi Mirim, Monte Alto, Nova Granada, Novo Horizonte, Piracicaba, Pongai, Potirendaba, Regianópolis, Ribeirão Preto, São Carlos, Santa Cruz da Conceição e Urupês

A estrutura genética da população de *D. citri* no Brasil foi estabelecida calculando-se o índice de fixação com a análise AMOVA, sendo que no AMOVA por grupos, as populações de Maringá (PR), Roraima (RR) e Divinópolis (MG), excluídas do cálculo pelo SAMOVA, foram incluídas no grupo 1, dada à predominância do Hap2 nestas populações.

As análises mostraram um alto índice de fixação (F_{ST}), tanto para todos os locais de coleta unidos em um só grupo, quanto para os grupos estabelecidos. Em ambos as análises, a porcentagem de variação entre todas as populações foi alta. Contudo, na análise com os três grupos, a variabilidade genética foi maior entre os grupos do que dentro dos mesmos (Tabela 2.4). Esses resultados indicam que as populações de *D. citri* do Brasil estão estruturadas.

Tabela 2.4 - Análise molecular de variância (AMOVA) para as amostras de *Diaphorina citri* baseada no gene COI considerando as amostras com um único grupo ou como os três grupos definidos pelas análises do SAMOVA 1.0

Fonte de Variação	Gl	Sq	Porcentagem de variação
Grupo único			
Entre populações	36	101,626	23,57
Dentro das populações	136	172,939	76,43
F _{ST} : 0,23572 p=0,00			
Três grupos			
Entre grupos	2	38,776	23,21
Entre populações do mesmo grupo	34	62,851	9,40
Dentro das populações	163	172,939	67,40
F _{SC} : 0,12238 p=0,00			
F _{ST} : 0,32604 p=0,00			
F _{CT} : 0,23205 p=0,00			

Os índices de diversidade molecular indicaram grande variabilidade de haplótipos e baixa diversidade genotípica, ou seja, há muitos haplótipos geneticamente próximos entre si. Outras estatísticas mostraram teste de neutralidade com valores negativos e $\pi < S$ (Tabela 2.5). Todas essas características indicam um cenário de expansão populacional.

As indicações iniciais da expansão populacional de *D. citri* no Brasil foram posteriormente corroboradas pelas análises de distribuição par a par (“mismatch distribution”), que testam para uma expansão demográfica repentina. Essas análises resultaram em curvas unimodais para todas as amostras tratadas como um grupo único [SSD = 0,119 p(sim≥obs) = 0,00; raggedness = 0,016 p(sim≥obs) = 1,00], ou quando apenas aquelas que compõem os grupos 1 [SSD=0,001 p(sim≥obs) = 0,93; raggedness = 0,038 p(sim≥obs) = 0,92] e 3 [SSD = 0,369 p(sim≥obs) = 0,00; raggedness = 0,012 p(sim≥obs) = 0,00] foram utilizadas, indicando a ocorrência de populações em expansão (Figura 2.3). No entanto, as análises em que as populações do grupo 2 foram utilizadas resultaram em uma curva bimodal [SSD = 0,005 p(sim≥obs) = 0,27; raggedness = 0,038 p(sim≥obs) = 0,54] (Figura 2.3), sugerindo a existência de populações em equilíbrio.

Tabela 2.5 - Resumo das estatísticas de diversidade genética em *Diaphorina citri*, como grupo único e com os três grupos definidos a partir do programa SAMOVA 1.0 (DP = desvio padrão)

	Diversidade haplotípica $\pm$ DP	Diversidade nucleotídica $\pm$ DP	D de Tajima	F de Fu	$\Theta\pi$	ΘS
Grupo único	0,849 $\pm$ 0,021	0,002 $\pm$ 0,001	-1,93 (p=0,00)	-26,48 (p=0,00)	2,71 (DP=1,60)	7,82 (DP=2,00)
Grupo1	0,683 $\pm$ 0,091	0,001 $\pm$ 0,001	-0,91 (p=0,93)	-7,16 (p=0,00)	1,19 (DP=0,87)	1,73 (DP=0,81)
Grupo2	0,927 $\pm$ 0,022	0,003 $\pm$ 0,001	-1,04 (p=0,90)	-4,85 (p=0,02)	3,09 (DP=1,83)	4,46 (DP=1,67)
Grupo3	0,756 $\pm$ 0,040	0,002 $\pm$ 0,001	-1,90 (p=0,00)	-26,76 (p=0,00)	2,59 (DP=1,54)	6,96 (DP=1,93)

Figura 2.3 – Distribuição das frequências do número de diferenças pareadas (“mismatch distribution”) entre as populações de *Diaphorina citri*. A) Referente ao grupos 1 e 3, definidos nas análises de SAMOVA, e grupo único; B) Referente ao grupo 2 (compostas primordialmente por haplótipos únicos), assim como definido nas análises de SAMOVA

A expansão populacional indicada pelas análises par a par também foram confirmadas pelas análises de “Bayesian skyline plots”, sendo visível o crescimento expressivo recente das populações de *D. citri* no Brasil (Figura 2.4).

Figura 2.4 – “Bayesian Skyline Plot” baseado na análise de todas as populações de *Diaphorina citri* amostradas no Brasil. A linha preta representa a mediana, enquanto as azuis mostram os limites 95% HPD (“high posterior density”)

Análises comparativas da similaridade das sequências de *COI* (517 bases) dos diferentes haplótipos determinados neste trabalho àquelas de *D. citri* de diversos países pelo método de distância genética, não resultou na formação de grupos com suporte estatístico (Figura 2.5). No entanto, foi possível verificar a formação de um grupo que reuniu os haplótipos definidos neste trabalho àqueles de populações da Indonésia (psy 26, 27, 28, 31), Brasil (psy 17, 43, 44), China (psy 51, 52, 54), Vietnã (psy 29 e 57), Taiwan (psy32), Tailândia (psy 34), República de Maurício (psy40) e Ilhas Reunião (psy41) (Figura 2.5).

Figura 2.5 – Árvore de Neighbor-Joining demonstrando a distância entre os diversos haplótipos de *Diaphorina citri* de populações do Brasil e de várias regiões do mundo utilizando o modelo de distância p, com 1.000 replicações de bootstrap. Os táxons psy (número) representam as sequências depositadas no NCBI, sendo o número referente à sua localidade. Os táxons Hap (número) se referem aos haplótipos definidos neste trabalho

2.2.4 Discussão

As análises de variabilidade genética de *D. citri* na principal região citrícola do Brasil, o estado de São Paulo, e em outras regiões do país, utilizando-se de sequências do gene da *COI* do DNA mitocondrial como marcador molecular, indicaram a existência de alta variabilidade haplotípica, mesmo com reduzida variabilidade nucleotídica. As análises ainda indicam a existência de estruturação populacional de *D. citri* no Brasil, com a formação de três grandes grupos de populações geneticamente homogêneas e isoladas geograficamente, as quais apresentam uma história demográfica de expansão populacional recente. A existência de dois haplótipos (Hap1 e Hap2) com alta frequência indica a existência de mais de um evento de introdução. A existência de eventos de introdução distintos, associada à expansão populacional recente desse psílídeo no país, condiz com os registros de ocorrência das bactérias causadoras do HLB no país, as quais só foram detectadas em meados de 2000 (TEIXEIRA et al., 2005b).

A análise da variabilidade genética de *D. citri* ainda tem algumas características interessantes, como a riqueza de haplótipos frequentes e o alto número de mutações não-sinônimas. A riqueza de haplótipos frequentes (Hap1 ao Hap17) não pode ser explicada somente por mutação e isolamento entre as subpopulações, visto que os registros de ocorrência de *D. citri* no Brasil são da década de 40, o que não permitiria o desenvolvimento da divergência genética observada (COSTA LIMA, 1943). Dessa forma, a variabilidade genética de *D. citri* no Brasil poderia ser explicada tanto pela ocorrência de mais de um evento de introdução e/ou de que a(s) população(ões) introduzida(s) já continha(m) elevada variabilidade genética. Análises comparativas da similaridade genotípica dos haplótipos de *D. citri* do Brasil com aqueles do resto do mundo indicaram que a(s) população(ões) desse inseto introduzida(s) no Brasil foram originadas do sudoeste da Ásia, tido como o provável centro de origem desse psílídeo (HALL, 2008). Essa análise também demonstra quão contrastante a diversidade genética das populações de *D. citri* no Brasil é em relação às populações de várias regiões do mundo, dando sustentação à existência do evento recente de expansão populacional indicado. No entanto, a baixa diversidade haplotípica identificada em populações de *D. citri* distribuídas pelo mundo e disponíveis no NCBI deve ser

interpretada com cautela, visto que as sequências disponíveis representam apenas a porção 3' do gene da *COI*, o qual não apresenta a mesma variabilidade da região 5', assim como observado nas sequências de *COI* obtidas neste trabalho e indicado para inúmeras espécies de insetos, sendo a mesma utilizada para o “barcoding” de espécies (HERBET; GREGORY, 2005). As sequências de *COI* de *D. citri* disponíveis no NCBI contam com apenas 517 bases e 18 sítios informativos.

As populações de *D. citri* no Brasil também são marcadas pela ocorrência de um número elevado de haplótipos únicos, muitos dos quais decorrentes de mutações não-sinônimas. Apesar da indicação de que esses haplótipos raros tendam a desaparecer da população ao longo do tempo (BROWN et al., 1996), a ocorrência de mutações que levaram a produção de proteínas únicas pode ter dado origem a fenótipos que apresentam respostas distintas aos processos de seleção do ambiente (KUSSEL; LEIBLER, 2005). É evidente que mutações que levam a novos fenótipos, as quais raramente são neutras, podem favorecer ou não a permanência e multiplicação dos mesmos na população. Dada a inexistência de métodos eficientes de combate ao HLB (LOPES et al., 2007), o vetor *D. citri* tem sido o alvo principal no controle da doença no país, principalmente pela utilização intensa de agrotóxicos (YAMAMOTO et al., 2009). Agrotóxicos exercem forte pressão de seleção e a adoção periódica desse método de controle pode estar levando à eliminação não-seletiva de haplótipos, podendo favorecer a expansão dos haplótipos raros oriundos de mutações não-sinônimas, principalmente se as mesmas forem associadas a genes ligados à resistência de insetos aos inseticidas em uso (BASS, FIELD, 2011). A distribuição geográfica dos haplótipos de *D. citri* torna visível a presença de grupos bem definidos, representados pela dominância do Hap1 (grupo 3 - vermelho), Hap2 (grupo 1 - amarelo) ou de haplótipos únicos (grupo cinza). A formação desses grupos é sustentada pelos altos valores de F_{ST} , dado que as análises de AMOVA das populações como um grupo único resultou em valor de $F_{ST} = 0,32$, muito superior aos $F_{ST} = 0,25$, já considerado um valor elevado para indicar estruturação de populações (HARLT; CLARCK, 2010). Os valores de F_{ST} obtidos para os grupos individualizados foi ainda maior, dando completa sustentação aos mesmos.

No entanto, apesar do grupo vermelho estar distribuído mais ao centro-sul do estado de São Paulo, com predominância do grupo amarelo na região noroeste do

estado, a população de Roraima foi semelhante ao grupo do vermelho (predominantemente Hap1). Apesar da inexistência de dados de fluxo gênico em *D. citri* e das informações conflitantes em relação à sua capacidade de dispersão (BOINA et al., 2009a; KOBORI et al., 2011), é provável que a proximidade genética entre a população de Roraima e aquelas do grupo vermelho (Hap1) seja decorrente de transporte passivo, dado pela atividade humana, visto a maior diversidade genética encontrada entre populações próximas desse inseto no estado de São Paulo se comparadas àquela de Roraima, que se encontra a mais de 3.000 km de distância. A mesma situação pode explicar o fato da população de Minas Gerais ser geneticamente similar as populações do grupo amarelo, localizados mais ao nordeste do estado de São Paulo do que as populações do centro do estado.

Ao saber da estrutura populacional é necessário compreender a história demográfica da formação desses grupos. Os cálculos de diversidade haplotídica (H) e nucleotídica (π) indicam $H > \pi$, o que significa que existem muitos haplótipos geneticamente similares, ou seja, há poucas mutações que diferem um haplótipo do outro, característico de evento de expansão recente. Este cenário de expansão foi confirmado pelos testes de neutralidade, sendo que no teste D de Tajima o grupo único e o grupo 3 apresentaram valores negativos e significativos, e os valores para os grupos 1 e 2 também foram negativos, mas não significativo. Entretanto, no teste F de Fu e Li, todos os grupos apresentaram valores negativos e significativos, indicando o excesso de alelos raros, comum a populações em expansão (TAJIMA, 1983). A expansão das populações de *D. citri* no Brasil também é sustentada pelos menores valores de diversidade nucleotídica ($\theta\pi$) em relação aos de número de sítios segregantes (θ_S) ($\theta\pi < \theta_S$), indicativo de populações em crescimento ou da presença de seleção balanceadora (HALMITON, 2009). Assim, todos os grupos deste trabalho resultaram em valores de $\theta\pi < \theta_S$, condizendo com o quadro de populações em expansão.

Os diferentes grupos populacionais encontram parecem apresentar histórias demográficas distintas, assim como indicado pelas análises da distribuição par a par (“mismatch distribution”). O padrão bimodal da curva de distribuição obtida para o grupo integrado pelos haplótipos únicos (grupo 2) é indicativo de que estas populações

tenham passado por um evento de gargalo ou sofrido a mistura de mais de uma população, visto que esta análise não assume a presença de grupos (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2004). Vale ressaltar que este grupo se localiza na zona de transição entre os grupos 1 (amarelo - Hap2) e 3 (vermelho – Hap1), sendo possível que a mesma represente a área em que ocorra o encontro das populações dos grupos 1 e 3 à medida que as populações dos mesmos se expandem. Por outro lado, a distribuição unimodal, encontrada para os grupos único, 1 e 3, é normalmente indicativa de populações que sofreram processo de expansão (ROGERS; HARPENDING, 1992). .

Em termos matemáticos esses gráficos são analisados pela soma dos desvios quadrados (SSD) e pelo índice de Raggedness, que apresentam valores baixos em distribuições unimodais e valores altos em distribuições multimodais, sendo que quando não significativos indicam que as populações se ajustam a hipótese de expansão. Contudo, neste trabalho observou-se valores altos de SSD para distribuição unimodal (grupo 3) e valores baixos para distribuição bimodal (grupo 2). Ainda, estes índices se mostraram significantes para o grupo 3 ($p=0,00$), o que representaria um grupo com populações que se ajusta ao modelo de estabilidade, o que provavelmente não é verdadeiro, visto que o grupo 3 (vermelho – Hap1) é claramente o que mais se expandiu pelo território após a colonização, fato confirmado por este grupo apresentar os maiores valores negativos nos teste de neutralidade e a maior diferença entre $\theta\pi$ e θ_S . A incongruência entre alguns dos índices obtidos nas análises de distribuição par a par poderia ser explicada pela similaridade genética entre os haplótipos, apesar da estruturação populacional observada, e pela ocorrência de um processo de expansão muito recente e rápido, sendo que o método de distribuição par a par incapaz de definir este cenário com clareza. Esta rápida expansão recente foi confirmada pelas análises do “*Bayesian skyline plots*”, apesar do marcador utilizado não permitir a datação precisa dos eventos em questão e a análise não ser fina o suficiente para verificar mais de um pico de expansão populacional correspondente a mais de evento de introdução. Assim, para que essas questões sejam solucionadas seria necessária a utilização de outros marcadores moleculares, como genes nucleares e microssatélites.

2.3 Conclusões

- As populações de do estado de São Paulo *Diaphorina citri* são estruturadas;
- As populações de *D. citri* apresentam diversidade haplotípica elevada, apesar da baixa diversidade genotípica;
- As variações genotípicas encontradas, apesar de reduzidas, levam a alterações na sequência proteica da *COI* de *D. citri*;
- As populações de *D. citri* estão divididas em três grupos geneticamente distintos;
- *D. citri* está passando por um processo de expansão populacional recente;
- Ocorreram, pelo menos, dois eventos de introdução de psílídeos no Brasil, ambos de populações oriundas do mesmo centro de origem;
- As similaridades das sequências de *COI* de *D. citri* do Brasil e aquelas disponíveis no NCBI indicam o sudeste asiático como local de origem das populações introduzidas no Brasil.

Referências

AOKI, K.; KATO, M.; MURAKAMI, N. Glacial bottleneck and postglacial recolonization of a seed parasitic weevil, *Curculio hilgendorfi*, inferred from mitochondrial DNA variation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 14, p. 3276-3289, July 2008.

AVISE, J.C. Perspective: conservation genetics enters the genomics era. **Conservation Genetics**, Amsterdam, v. 11, n. 2, p. 665-669, Apr. 2010.

AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 18, p. 489-522, Nov. 1987.

BALLARD, J.W.O.; WHITLOCK, M.C. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 729-744, Apr. 2004.

BARNABE, C.; BRISSE, S.; TIBAYRENC, M. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. **Parasitology**, Cambridge, v. 120, p. 513-526, May 2000.

BASS, C.; FIELD, L.M. Gene amplification and insecticide resistance. **Pest Management Science**, Sussex, v. 67, n. 8, p. 886-890, Aug. 2011.

BEHURA, S.K. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, n. 11, p. 3087-3113, Oct. 2006.

BIRKY, C.W. Evolution and population genetics of organelle genes - Mechanisms and models. In: SYMPOSIUM ON EVOLUTION AT THE MOLECULAR LEVEL, 1991, Pennsylvania. **Proceedings...** Pennsylvania: Penn State University, 1991. p. 112-134.

BOHONAK, A.J. Dispersal, gene flow, and population structure. **Quarterly Review of Biology**, New York, v. 74, n. 1, p. 21-45, Mar. 1999.

BOINA, D.R.; MEYER, W.L.; ONAGBOLA, E.O.; STELINSKI, L.L. Quantifying dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) by immunomarking and potential impact of unmanaged groves on commercial citrus management. **Environmental Entomology**, College Park, v. 38, n. 4, p. 1250-1258, Aug. 2009.

BOINA, D.R.; ONAGBOLA, E.O.; SALYANI, M.; STELINSKI, L.L. Antifeedant and sublethal effects of imidacloprid on Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 65, n. 8, p. 870-877, Aug. 2009.

BOORE, J.L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 27, n. 8, p. 1767-1780, Apr. 1999.

BOSSART, J.L.; PROWELL, D.P. Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 13, n. 5, p. 202-206, Mai 1998.

BOVE, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 88, n. 1, p. 7-37, Mar. 2006.

BROMILOW, S.M.; SPERLING, F.A.H. Phylogeographic signal variation in mitochondrial DNA among geographically isolated grassland butterflies. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 38, n. 2, p. 299-310, Feb. 2011.

BROWN, B.L.; EPIFANIO, J.M.; SMOUSE, P.E.; KOBAC, C.J. Temporal stability of mtDNA haplotype frequencies in American shad stocks: to pool or not to pool across years? **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 53, n. 10, p. 2274-2283, Oct. 1996

BROWN, W.M.; PRAGER, E.M.; WANG, A.; WILSON, A.C. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 18, n. 4, p. 225-239, July 1982.

BURNS, J.M.; JANZEN, D.H.; HAJIBABAEI, M.; HALLWACHS, W.; HEBERT, P.D.N. DNA Barcode of closely related (but morphologically and ecologically distinct) species of skipper butterflies (Hesperiidae) can differ by only one to three nucleotides. **Journal of the Lepidopterists' Society**, Los Angeles, v. 61, n. 3, p. 138-153, 2007.

CARMICHAEL, L.E.; KRIZAN, J.; NAGY, J.A.; FUGLEI, E.; DUMOND, M.; JOHNSON, D.; VEITCH, A.; BERTEAUX, D.; STROBECK, C. Historical and ecological determinants of genetic structure in arctic canids. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, n. 16, p. 3466-3483, Aug. 2007.

CHARLESWORTH, B.; CHARLESWORTH, D.; BARTON, N.H. The effects of genetic and geographic structure on neutral variation. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 34, p. 99-125, Nov. 2003.

CHEN, G.; HARES, M.P. Cryptic diversity and comparative phylogeography of the estuarine copepod *Acartia tonsa* on the US Atlantic coast. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 20, n. 11, p. 2425-2441, June 2011.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 10, p. 1657-1659, Oct. 2000.

COLETTA, H.D.; TAKITA, M.A.; TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A. Analysis of 16S rDNA sequences from citrus huanglongbing bacteria reveal a different "Ca. Liberibacter" strain associated with citrus disease in Sao Paulo. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 8, p. 848-852, Aug. 2005.

COLETTA, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU, J.; MACHADO, M.A.; MULLER, G.W. First report of the causal agent of huanglongbing ("Candidatus Liberibacter asiaticus") in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 12, p. 1382-1382, Dec. 2004.

COLLET, T.; FERREIRA, K.M.; ARIAS, M.C.; SOARES, A.E.E.; DEL LAMA, M.A. Genetic structure of Africanized honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI-COII patterns. **Heredity**, London, v. 97, n. 5, p. 329-335, Nov. 2006.

COSTA LIMA, A. **Insetos do Brasil**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1943. 141 p.

CRANDALL, K.A.; TEMPLETON, A.R. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. **Genetics**, Pittsburgh, v. 134, n. 3, p. 959-969, July 1993.

DRUMMOND, A.J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **Bmc Evolutionary Biology**, New York, v. 7, Nov. 2007. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2148/7/214>>. Acesso em: 05 out. 2010.

DRUMMOND, A.J.; RAMBAUT, A.; SHAPIRO, B.; PYBUS, O.G. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 22, n. 5, p. 1185-1192, May 2005.

- DUPANLOUP, I.; SCHNEIDER, S.; EXCOFFIER, L. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, p. 2571-2581, Sept. 2002.
- EMERSON, B.C.; PARADIS, E.; THEBAUD, C. Revealing the demographic histories of species using DNA sequences. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 16, n. 12, p. 707-716, Dec. 2001.
- ESTOUP, A.; BEAUMONT, M.; SENNEDOT, F.; MORITZ, C.; CORNUET, J.M. Genetic analysis of complex demographic scenarios: spatially expanding populations of the cane toad, *Bufo marinus*. **Evolution**, Lancaster, v. 58, n. 9, p. 2021-2036, Sept. 2004.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 564-567, May 2010.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **A primer of conservation genetics**. Cambridge: University Press, 2004. 220 p.
- FU, Y.X.; LI, W. H. Maximum likelihood estimation of population parameters. **Genetics**, Pittsburgh, v. 134, n. 4, p. 1261-1270, Aug. 1993.
- GASPERI, G.; BONIZZONI, M.; GOMULSKI, L.M.; MURELLI, V.; TORTI, C.; MALACRIDA, A.R.; GUGLIELMINO, C.R. Genetic differentiation, gene flow and the origin of infestations of the medfly, *Ceratitis capitata*. **Genetica**, Dordrecht, v. 116, n. 1, p. 125-135, Sept. 2002.
- HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 87, n. 3, p. 330-353, Sept. 2004.
- HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.L.; RAMADUGU, C.; BRODIE, M.W.; WEBB, S.E.; LEE, R.F. Trailers transporting oranges to processing plants move Asian citrus psyllids. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 93, n. 1, p. 33-38, Mar. 2010.
- HALL, D.G. Biology, history and world status of *Diaphorina citri*. In: TALLER INTERNACIONAL SOBRE HUANGLONGBING DE LOS CÍTRICOS (*Candidatus Liberibacter* spp) Y El Psílido Asiático De Los Cítricos (*Diaphorina citri*), 1., 2008, Hermosillo, Sonora. **Proceedings...** Sonora, 2008. p. 1-11.
- HAMILTON, M.B. **Populations genetics**. Chichester: Wiley-Blackwell, 2009. 407 p
- HARLT, D.H.; CLARCK, A.G. **Princípios de genética de populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 660 p.

HAVILL, N.P.; MONTGOMERY, M.E.; YU, G.Y.; SHIYAKE, S.; CACCONE, A. Mitochondrial DNA from hemlock woolly adelgid (Hemiptera : Adelgidae) suggests cryptic speciation and pinpoints the source of the introduction to eastern North America. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 99, n. 2, p. 195-203, Mar. 2006.

HEBERT, P.D.N.; GREGORY, T.R. The promise of DNA barcoding for taxonomy. **Systematic Biology**, Washington, v. 54, n. 5, p. 852-859, Oct. 2005.

HOY, M.A.; SINGH, R.; ROGERS, M.E. Evaluations of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 93, n. 1, p. 24-32, Mar. 2010.

HURLEY, B.P.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, B.D.; GOVENDER, P.; SMITH, J.E.; WINGFIELD, M.J. Genetic diversity of *Bradysia difformis* (Sciaridae: Diptera) populations reflects movement of an invasive insect between forestry nurseries. **Biological Invasions**, Amsterdam, v. 12, n. 4, p. 729-733, Apr. 2010.

ICHINOSE, K.; BANG, D.V.; TUAN, D.H.; DIEN, L.Q. Effective use of neonicotinoids for protection of citrus seedlings from invasion by *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 1, p. 127-135, Feb. 2010.

JARNE, P.; THERON, A. Genetic structure in natural populations of flukes and snails: a practical approach and review. **Parasitology**, Cambridge, v. 123, p. 27-40, July 2001.

JOURDIE, V.; ALVAREZ, N.; MOLINA-OCHOA, J.; WILLIAMS, T.; BERGVINSON, D.; BENREY, B.; TURLINGS, T.C.J.; FRANCK, P. Population genetic structure of two primary parasitoids of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera), *Chelonus insularis* and *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera): to what extent is the host plant important? **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, n. 10, p. 2168-2179, May 2010.

KIMURA, M. Rate of molecular evolution considered from standpoint of population genetics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 63, n. 4, p. 1181-1188, Aug. 1969.

KINGMAN, J.F.C. Origins of the coalescent: 1974-1982. **Genetics**, Pittsburgh, v. 156, n. 4, p. 1461-1463, Dec. 2000.

KNERR, L.D.; STAUB, J.E.; HOLDER, D.J.; MAY, B.P. Genetic diversity in *Cucumis sativus* L assessed by variation at 18 allozyme coding loci. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 78, n. 1, p. 119-128, Mar. 1989.

KOBORI, Y.; NAKATA, T.; OHTO, Y.; TAKASU, F. Dispersal of adult Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), the vector of citrus greening disease, in artificial release experiments. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 46, n. 1, p. 27-30, Feb. 2011.

KROSCH, M.N.; BAKER, A.M.; MATHER, P.B.; CRANSTON, P.S. Spatial population genetic structure reveals strong natal site fidelity in *Echinocladius martini* (Diptera: Chironomidae) in northeast Queensland, Australia. **Freshwater Biology**, Oxford, v. 56, n. 7, p. 1328-1341, July 2011.

KUSSELL, E.; LEIBLER, S. Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments. **Science**, Washington, v. 309, n. 5743, p. 2075-2078, Sept. 2005.

LANZAVECCHIA, S.B.; CLADERA, J.L.; FACCIO, P.; MARTY, N.P.; VILARDI, J.C.; ZANDOMENI, R.O. Origin and distribution of *Ceratitis capitata* mitochondrial DNA haplotypes in Argentina. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 101, n. 3, p. 627-638, May 2008.

LI, T.; ZHANG, M.; QU, Y.H.; REN, Z.M.; ZHANG, J.Z.; GUO, Y.P.; HEONG, K.L.; VILLAREAL, B.; ZHONG, Y.; MA, E. Population genetic structure and phylogeographical pattern of rice grasshopper, *Oxya hyla intricata*, across Southeast Asia. **Genetica**, Dordrecht, v. 139, n. 4, p. 511-524, Apr. 2011.

LINTON, Y.M.; MORDUE, A.J.; CRUICKSHANK, R.H.; MEISWINKEL, R.; MELLOR, P.S.; DALLAS, J.F. Phylogenetic analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene of five species of the *Culicoides imicola* species complex. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 16, n. 2, p. 139-146, June 2002.

LOMBAERT, E.; GUILLEMAUD, T.; THOMAS, C.E.; LAWSON HANDLEY, L.J.; LI, J.; WANG, S.; PANG, H.; GORYACHEVA, I.; ZAKHAROV, I.A.; JOUSSELIN, E.; POLAND, R.L.; MIGEON, A.; LENTEREN, J. VAN; DE CLERCQ, P.; BERKVEN, N.; JONES, W.; ESTOUP, A. Inferring the origin of populations introduced from a genetically structured native range by approximate Bayesian computation: case study of the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 20, p. 4654-4670, Oct. 2011.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A.J.; BARBOSA, J.C. Ineffectiveness of pruning to control citrus huanglongbing caused by *Candidatus Liberibacter americanus*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 119, n. 4, p. 463-468, Dec. 2007.

LOXDALE, H.D. Rapid genetic changes in natural insect populations. **Ecological Entomology**, London, v. 35, p. 155-164, Jan. 2010.

MAYNARD SMITH, J.; SMITH, N.H. Recombination in animal mitochondrial DNA. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 19, n. 12, p. 2330-2332, Dec. 2002.

MICHAUD, J.P.; OLSEN, L.E. Suitability of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, as prey for ladybeetles. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 49, n. 4, p. 417-431, Aug. 2004.

MILLER, S.E. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 12, p. 4775-4776, Mar. 2007.

MOORE, W.S. Inferring phylogenies from mtDNA variation mitochondrial gene trees versus nuclear gene trees. **Evolution**, Lancaster, v. 49, n. 4, p. 718-726, Aug. 1995.

MORITZ, C. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation – a critical review. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 401-411, Aug. 1994.

NAVA, D.E.; GOMEZ-TORRES, M.L.; RODRIGUES, M.D.; BENTO, J.M.S.; HADDAD, M.L.; PARRA, J.R.P. The effects of host, geographic origin, and gender on the thermal requirements of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 39, n. 2, p. 678-684, Apr. 2010.

NEI, M. Variation and covariation of gene frequencies in subdivided populations. **Evolution**, Lancaster, v.19, n.2, p. 256-258, June 1965.

NEIGEL, J.E. Is F-ST obsolete? **Conservation Genetics**, Amsterdam, v. 3, n. 2, p. 167-173, Nov. 2002.

NORGATE, M.; CHAMINGS, J.; PAVLOVA, A.; BULL, J.K.; MURRAY, N.D.; SUNNUCKS, P. Mitochondrial DNA indicates late pleistocene divergence of populations of *Heteronympha merope*, an emerging model in environmental change biology. **Plos One**, San Francisco, v. 4, n. 11, Nov 2009. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0007950>>. Acesso em: 04 nov. 2010.

PEARSE, D.E.; CRANDALL, K.A. Beyond F(ST): Analysis of population genetic data for conservation. **Conservation Genetics**, Amsterdam, v. 5, n. 5, p. 585-602, Nov. 2004.

PICARD, C.J.; WELLS, J.D. The population genetic structure of North American *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae), and the utility of genetic assignment methods for reconstruction of postmortem corpse relocation. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 195, n. 1/3, p. 63-67, Feb. 2010.

PINHO, C.; HARRIS, D.J.; FERRAND, N. Comparing patterns of nuclear and mitochondrial divergence in a cryptic species complex: the case of Iberian and North African wall lizards (Podarcis, Lacertidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 91, n. 1, p. 121-133, May 2007.

PORRETTA, D.; CANESTRELLI, D.; BELLINI, R.; CELLI, G.; URBANELLI, S. Improving insect pest management through population genetic data: a case study of the mosquito *Ochlerotatus caspius* (Pallas). **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 44, n. 3, p. 682-691, June 2007.

QURESHI, J.A.; STANSLY, P.A. Dormant season foliar sprays of broad-spectrum insecticides: An effective component of integrated management for *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in citrus orchards. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 8, p. 860-866, Aug. 2010.

REMAIS, J.V.; XIAO, N.; AKULLIAN, A.; QIU, D.C.; BLAIR, D. Genetic assignment methods for gaining insight into the management of infectious disease by understanding pathogen, vector, and host movement. **Plos Pathogens**, San Francisco, v. 7, n. 4, Apr. 2011. Disponível em: <http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1002013> >. Acesso em: 24 maio 2011

ROGERS, A.R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 9, p. 552-569, May 1992.

ROLLINS, L.A.; WOOLNOUGH, A.P.; SINCLAIR, R.; MOONEY, N.J.; SHERWIN, W.B. Mitochondrial DNA offers unique insights into invasion history of the common starling. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 20, n. 11, p. 2307-2317, June 2011.

ROSENBERG, N.A.; NORDBORG, M. Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 3, n. 5, p. 380-390, May 2002.

ROY, M.S.; GIRMAN, D.J.; TAYLOR, A.C.; WAYNE, R.K. The use of museum specimens to reconstruct the genetic variability and relationship of extinct populations. **Experientia**, Basel, v. 50, n. 6, p. 551-557, June 1994.

SCHLICK-STEINER, B.C.; STEINER, F.M.; MODER, K.; SEIFERT, B.; SANETRA, M.; DYRESON, E.; STAUFFER, C.; CHRISTIAN, E. A multidisciplinary approach reveals cryptic diversity in Western Palearctic Tetramorium ants (Hymenoptera : Formicidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 40, n. 1, p. 259-273, July 2006.

SEGELBACHER, G.; CUSHMAN, S.A.; EPPERSON, B.K.; FORTIN, M.J.; FRANCOIS, O.; HARDY, O.J.; HOLDEREGGER, R.; TABERLET, P.; WAITS, L.P.; MANEL, S. Applications of landscape genetics in conservation biology: concepts and challenges. **Conservation Genetics**, Amsterdam, v. 11, n. 2, p. 375-385, Apr. 2010.

SHAO, R.; BARKER, S.C. Mitochondrial genomes of parasitic arthropods: implications for studies of population genetics and evolution. **Parasitology**, Cambridge, v. 134, p. 153-167, Feb. 2007.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 87, n. 6, p. 651-701, Nov. 1994

SKELLEY, L.H.; HOY, M.A. A synchronous rearing method for the Asian citrus psyllid and its parasitoids in quarantine. **Biological Control**, Orlando, v. 29, n. 1, p. 14-23, Jan. 2004.

SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, Washington, v. 236, n. 4803, p. 787-792, May 1987.

_____. Population structure and evolutionary progress. **Genome**, Ottawa, v. 31, n. 1, p. 196-202, Jan. 1989.

SONG, H.; BUHAY, J.E.; WHITING, M.F.; CRANDALL, K.A. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washigton, v. 105, n. 36, p. 13486-13491, Sept. 2008.

STRASBURG, J.L.; RIESEBERG, L.H. Interpreting the estimated timing of migration events between hybridizing species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 20, n. 11, p. 2353-2366, June 2011.

SUNNUCKS, P.; HALES, D.F. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 13, n. 3, p. 510-524, Mar. 1996.

TAJIMA, F. Evolutionary relationship of DNA sequence in finite populations. **Genetics**, Pittsburgh, v. 105, n. 2, p. 437-460, June 1983.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, Oct. 2011.

TEIXEIRA, D.D.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET, J.L.; DA COSTA, P.I.; AYRES, A.J.; BOVE, J. '*Candidatus Liberibacter americanus*', associated with citrus huanglongbing (greening disease) in Sao Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1857-1862, Sept. 2005.

TEXEIRA, D.C.; AYRES, J.; DE BARROS, A.P.; KITAJIMA, E.W.; TANAKA, F.A.O.; DANET, L.; JAGOEIX-EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVE, J.M. First report of a huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil and association of a new liberibacter species, "*Candidatus Liberibacter americanus*", with the disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 1, p. 107-107, Jan. 2005.

- TRIPONEZ, Y.; BUERKI, S.; BORER, M.; NAISBIT, R.E.; RAHIER, M.; ALVAREZ, N. Discordances between phylogenetic and morphological patterns in alpine leaf beetles attest to an intricate biogeographic history of lineages in postglacial Europe. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 20, n. 11, p. 2442-2463, June 2011.
- TSAI, J.H.; LIU, Y.H. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera : Psyllidae) on four host plants. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, n. 6, p. 1721-1725, Dec. 2000.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Lancaster, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, Nov. 1984.
- WEIR, B.S.; HILL, W.G. Estimating F-statistics. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 36, p. 721-750, June 2002.
- WRIGHT, S. Genetical structure of populations. **Nature**, London, v. 166, n. 4215, p. 247-249, Apr. 1950.
- YAMAMOTO, P.T.; PAIVA, P.E.B.; GRAVENA, S. Flutuação populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em pomares de citros na região norte do estado de São Paulo. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 165-170, mar. 2001.
- YAMAMOTO, P.T.; FELIPPE, M.R.; SANCHES, A.L.; COELHO, J.H.C.; GARBIM, L.F.; XIMENES, N.L. Eficácia de Inseticidas para o manejo de *Diaphorina citri* kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em citros. **BioAssay**, Londrina, v. 4, n. 4, p. 9, Aug. 2009.
- YANG, Y.P.; HUANG, M.D.; BEATTIE, G.A.C.; XIA, Y.L.; OUYANG, G.C.; XIONG, J.J. Distribution, biology, ecology and control of the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, a major pest of citrus: A status report for China. **International Journal of Pest Management**, London, v. 52, n. 4, p. 343-352, Dec. 2006.
- ZHANG, D.X.; HEWITT, G.M. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 143-150, May 1997.

3 CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE *Wolbachia* ASSOCIADAS A *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (HEMIPTERA: PSYLLIDAE)

Resumo

Wolbachia é um simbiote comum entre os invertebrados, sendo muitos os estudos realizados com esta α -proteobactéria devido à sua capacidade de interferir no processo de reprodução de seus hospedeiros. No entanto, além das alterações na determinação sexual, *Wolbachia* pode influenciar a nutrição e o sistema imune, sendo crescentes as descobertas de novas funções desta bactéria. Assim, considerando as características de transmissão e o impacto que *Wolbachia* pode causar no crescimento populacional do hospedeiro devido às mudanças na reprodução, vários métodos de manipulação desse simbiote têm sido propostos como alternativas para o controle de insetos-pragas vetores de doenças ao homem e às plantas cultivadas. O psílídeo *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae) é hoje uma importante praga da citricultura nacional devido à sua associação às bactérias causadoras do “huanglongbing”, uma das mais devastadoras doenças dos citros. Apesar da associação *Wolbachia* - *D. citri* ser conhecida, tanto a frequência quanto a diversidade deste simbiote associado a *D. citri* permanecem desconhecidas, limitando a sua exploração no desenvolvimento de estratégias alternativas para o manejo desse inseto. Assim, dada a importância de *D. citri* na atividade citrícola do país e ao papel regulador que *Wolbachia* pode exercer sobre seus hospedeiros, este trabalho visou i) determinar a frequência natural de infecção de populações de *D. citri*, ii) caracterizar as linhagens de *Wolbachia* associadas às diferentes populações, via tipagem pela análise de sequências de multilocos (“multilocus sequencing typing - MLST”) e do gene *wsp*, e iii) verificar a associação hospedeiro-simbiote, via análise da interação DNA mitocondrial-sequências-tipo (ST) de *Wolbachia*. Indivíduos de *D. citri* coletados em 15 localidades, majoritariamente no estado de São Paulo, foram utilizados para a extração do DNA genômico e determinação da associação com *Wolbachia* via PCR-diagnósticos utilizando iniciadores para o gene *wsp* de *Wolbachia*, os quais indicaram 100% de infecção em todas as amostras. O MLST revelou a ocorrência de cinco STs (173, 174, 175, 225 e 236), enquanto que análises das sequências do *wsp* indicaram quatro tipos de *Wolbachia*. O ST-173 foi predominante, estando presente em todas as populações, enquanto que os demais foram populações-específicos. Análises da relação hospedeiro-simbiote não revelou a existência de relações específicas entre os haplótipos do hospedeiro e os STs de *Wolbachia*, nem a diminuição da diversidade nucleotídica de *D. citri* frente à infecção por mais de um ST do simbiote. A relação entre os STs de *Wolbachia* e as consequências desta diversidade ainda permanecem desconhecidas, mas a constatação de que *Wolbachia* ocorre em todas as populações e de que há um ST com distribuição abrangente abre caminhos para a utilização desse simbiote no controle alternativo de *D. citri*.

Palavras-chave: Controle biológico; Simbiote; Tipagem; Variabilidade

Abstract

Wolbachia is a common symbiont among invertebrates, and there are many studies with this α -*Proteobacteria* due to its ability to interfere with their host's reproduction. However, in addition to changes in the sex determination of their hosts, *Wolbachia* can also influence nutrition and the immune system, although new functions to this symbiont have been found. Thus, considering its mode of transmission and the impact it can have on the host population growth due to changes in reproduction, different methods for symbiont manipulation have been proposed as alternative strategies to control insect pests or vectors of diseases to humans and plants. The psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera, Psyllidae) is an important pest of citrus because of their association with the bacterium that causes the "huanglongbing," one of the most devastating diseases in citrus. Despite the fact that the association *Wolbachia* - *D. citri* is already known, the frequency and the diversity of *Wolbachia* associated with *D. citri* remains unknown, limiting their utilization for the development of alternative strategies for insect management. Thus, given the importance of *D. citri* to the citrus industry and the regulatory role that *Wolbachia* play on their hosts, this study aimed to i) determine the natural rate of infection of populations of *D. citri*, ii) to characterize the *Wolbachia* strains associated with different populations of *D. citri* via "multilocus sequencing typing" (MLST) and *wsp* analysis, and iii) verify the association of the symbiont to particular genotypes of the host. Individuals of *D. citri* collected from 15 locations, mostly in the state of São Paulo, were used for extraction of their genomic DNA and subjected to diagnostic PCR analysis for *Wolbachia* detection. Analysis indicated *Wolbachia* infects 100% of all specimens tested from all 15 populations sampled. MLST revealed the occurrence of five new sequence-types (STs) of *Wolbachia* (173, 174, 175, 225 and 236), while analysis based on the *wsp* sequences indicated only four different types of *Wolbachia*. ST-173 was predominant, occurring in all tested populations, while the remaining STs were population-specific. Analysis of the host-symbiont relationship did not reveal any particular association of *Wolbachia* and host haplotypes or a decrease in nucleotide diversity of *D. citri* in populations where more than a ST was recorded. The consequences of the diversity of STs reported are still unknown, but the fact that *Wolbachia* is fixed in all populations and that there is a ST with a broad distribution highlights the use of this symbiont as an alternative strategy to control *D. citri*.

Keywords: Biological control; Symbiont; Typing; Variability

3.1 Introdução

Nos últimos 20 anos, muitas são as pesquisas que ilustram a diversidade e a importância da interação entre bactérias simbiotes e insetos. Bactérias simbiotes podem estar associadas a insetos de forma obrigatória ou facultativa, estabelecendo relações distintas de simbiose. As bactérias obrigatoriamente associadas a insetos estabelecem relações de mutualismo, aumentando a aptidão biológica do hospedeiro,

enquanto aquelas associadas de forma facultativa estabelecem interações que podem resultar em relações benéficas, neutras ou prejudiciais ao inseto hospedeiro (BUCHNER, 1965; BAUMANN, 2005; HARRIS et al., 2010).

Em insetos, são diversas as interações de simbiose, especialmente no que se refere ao papel dos simbiossitos na biologia do hospedeiro, destacando-se os simbiossitos facultativos que participam do processo de regulação da reprodução, modulando a determinação sexual do hospedeiro (ANDERSON; KARR, 2001). Neste caso, nem sempre essas bactérias beneficiam seu hospedeiro e, portanto, devem encontrar outros meios para se propagar na população. Um desses meios é a incompatibilidade citoplasmática, na qual o simbiote se dissemina na população por beneficiar a reprodução de fêmeas infectadas em comparação àquelas apossimbiossitos (GODFRAY, 2010). Entre esses simbiossitos encontra-se a α -proteobactéria *Wolbachia*, um simbiote citoplasmático facultativo comum a insetos, crustáceos, ácaros e nematóides. Até os anos 70, poucos estudos eram realizados com esta bactéria, mas a descoberta de que *Wolbachia pipiens* era responsável pela incompatibilidade de cruzamentos entre machos de *Culex pipiens* Linnaeus, 1758 (Diptera: Culicidae) infectados com fêmeas saudáveis, estimulou a investigação da distribuição e do efeito deste simbiote em outros organismos (YEN; BARR, 1971; STOUTHAMER; BREEUWER; HURST, 1999).

Wolbachia é o mais comum manipulador da determinação de sexos em insetos, favorecendo sua disseminação na população do hospedeiro via indução de um ou mais de seus quatro efeitos sobre o hospedeiro: incompatibilidade citoplasmática (IC) (YEN; BARR, 1971), feminização de machos (ROUSSET; VAUTRIN; SOLIGNAC, 1992), morte de machos (HURST et al., 1999) e indução da telitoquia (STOUTHAMER, 1993).

Por ser responsável por diversos efeitos no hospedeiro e infectar grande parte do filo Arthropoda, *Wolbachia* apresenta várias linhagens designadas pela alteração causada e nomeadas dependendo do hospedeiro infectado. As linhagens mais estudadas são as indutoras de IC (IC-*Wolbachia*), que levam o zigoto à morte em espécies diploides ou à produção de machos em espécies haplodiploides (STOUTHAMER; BREEUWER; HURST, 1999). A incompatibilidade citoplasmática pode ser uni ou bidirecional (WERREN, 1997). A incompatibilidade unidirecional típica acontece quando o espermatozoide de um macho infectado por *Wolbachia* fertiliza um ovo de

uma fêmea não-infectada, enquanto a bidirecional ocorre quando macho e fêmea possuem diferentes linhagens de *Wolbachia*, mutuamente incompatíveis. O cruzamento macho não-infectado vs. fêmea infectada é compatível, portanto, *Wolbachia* poderá infectar rapidamente toda população (WERREN, 1997).

Associações com *Wolbachia* também podem resultar em outras alterações nas características biológicas do hospedeiro que podem influenciar de forma positiva ou negativa a aptidão biológica dos mesmos. São crescentes os estudos que relatam os efeitos benéficos da associação a *Wolbachia*, tornando hospedeiros mais resistentes a fontes de estresse, como temperatura e doenças (MOREIRA et al., 2009; BIAN et al., 2010). Porém, há também relatos que indicam os efeitos deletérios dessa associação na aptidão reprodutiva do hospedeiro, os quais apresentam, por exemplo, menor longevidade e fecundidade (WEEKS et al., 2002; TURELLI, 2010).

Deste modo, as próprias características da bactéria para o estabelecimento de associações patogênicas que levam à redução da aptidão biológica de seus hospedeiros e a sua capacidade de interferir no processo de reprodução do hospedeiro tem sido exploradas para o desenvolvimento de estratégias alternativas para o controle de insetos-pragas, principalmente os vetores de doenças (MCMENIMAN et al. 2009; MOREIRA et al., 2009; ZABALOU et al., 2009). *Wolbachia* também tem sido investigada como veículo para a introdução de genes que levem à produção de compostos com atividade antimicrobiana, por exemplo (BIAN et al., 2010). Os resultados promissores obtidos nos estudos mencionados despertam para a possibilidade de utilização de *Wolbachia* para o controle de pragas em ambientes agrícolas.

Diaphorina citri é um psílídeo comum aos pomares cítricos do estado de São Paulo e nos últimos anos tornou-se praga por transmitir as bactérias *Candidatus Liberibacter americanus* e *Ca. L. asiaticus*, causadoras do “huanglongbing” (HLB) ou “greening” (TEIXEIRA et al., 2005a). O HLB é uma doença devastadora, podendo levar à completa eliminação da citricultura em regiões infestadas (BOVÉ, 2006). No Brasil, *D. citri* foi primeiramente relatada em 1940; porém, os primeiros sintomas do HLB só foram registrados em 2004 (TEIXEIRA et al., 2005b).

Apesar dos métodos bem sucedidos de controle do vetor, a natureza do problema requer a erradicação do inseto ou métodos de controle da doença. Porém,

não há até o momento estratégias de manejo que permitam a cura de plantas infectadas (LOPES et al., 2007), ficando o controle da doença restrito ao controle do vetor. Essa estratégia exige o uso contínuo e intenso de agrotóxicos, o qual sempre é problemático devido ao desequilíbrio que pode causar no agroecossistema, eliminando espécies benéficas, contaminando o solo, cursos de água e o lençol freático, sem contar nos problemas decorrentes da seleção de genótipos do inseto resistentes à agrotóxicos (BASS; FIELD, 2011)

Assim, medidas alternativas que permitam o controle ou manejo do vetor/doença são extremamente positivas, o que torna a busca de novas abordagens, como a utilização de simbioses associados ao inseto, uma estratégia possível (DURVASULA et al., 1997; ZABALOU et al., 2004b; RUANG-AREERATE; KITTAYAPONG, 2006). Portanto, a utilização de simbioses no controle alternativo de *D. citri* é uma possibilidade, visto que populações de *D. citri* são comumente infectadas por *Wolbachia*, além de hospedarem o simbiote primário *Carsonella*, uma γ -proteobactéria, e dois simbioses secundários, *Arsenophonus* e uma β -proteobactéria, vulgarmente denominada de simbiote do sincício (SUBANDIYAH et al., 2000).

Porém, para considerar *Wolbachia* como possível agente para o desenvolvimento de métodos alternativos de controle, é crucial a compreensão de vários fatores que influenciam a atuação deste simbiote, tais como a localização da bactéria nos diferentes tecidos do hospedeiro, a intensidade de infecção, o genoma do hospedeiro e a linhagem de *Wolbachia* presente (WEEKS et al., 2002; BROWNLIE et al., 2007; JAENIKE, 2009). Assim, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a frequência de infecção de diversas populações de *D. citri* por *Wolbachia*, caracterizar a diversidade de linhagens de *Wolbachia* associadas a este inseto e definir a relação haplótipo hospedeiro – linhagem de *Wolbachia*, visando fornecer subsídios para o controle alternativo deste inseto-vetor.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Revisão bibliográfica

3.2.1.2 Simbiontes associados a insetos

Associações de bactérias simbiontes são extremamente comuns entre os invertebrados, sendo imensa a capacidade desses simbiontes de alterar a biologia de seus hospedeiros. Os simbiontes podem influenciar desde aspectos reprodutivos à nutrição de seus hospedeiros, abrangendo até mesmo a locomoção, além de, em alguns casos, beneficiar a competição interespecífica (BROWNLIE et al., 2007). Nestas associações, a bactéria estabelece um tipo de infecção que persiste no hospedeiro, e muitos invertebrados carregam bactérias simbiontes durante todo seu ciclo de vida, transmitindo-as vertical e/ou horizontalmente (BRIGHT; BULGHERESI, 2010).

As relações de simbiose podem ser de mutualismo, comensalismo, competição e parasitismo, sendo que cada interação pode ser benéfica ou prejudicial para o hospedeiro ou para o simbiote em diferentes fases de suas histórias de vida ou frente às mudanças nas condições ambientais (KLEPZING et al., 2009). Estudos sobre simbiose tornaram-se tema importante na biologia porque a simbiose atinge várias áreas, como os mecanismos de evolução, coadaptação e especiação (STOUTHAMER; BREEUWER; HURST, 1999; CURRIE, 2001; ZILBER-ROSENBERG; ROSENBERG, 2008), relação planta-herbívoro e interações tritróficas (OLIVER et al., 2003; CONN; WALKER; FRANCO, 2007), comunicação animal e organização social (RICHARD et al., 2007), dinâmica de populações (HOFSTETTER et al., 2006), invasão biológica (MOTA et al., 2006) e manejo integrado de pragas (HOSOKAWA et al., 2007).

Em insetos, os simbiontes podem ser vírus, fungos, protistas ou bactérias, se localizando externa (ectossimbiote) ou internamente (endossimbiote) ao corpo do hospedeiro. Os endossimbiontes podem ser extra ou intracelulares, sendo os últimos denominados endocitobiontes (KROEMER; WEBB, 2004; MORAN, 2006).

Entre os endossimbiontes extracelulares destacam-se os microrganismos do intestino, os quais são bem estudados em Isoptera, Blattodea e Hemiptera (BUCHNER 1965; NAKAJIMA et al., 2005; HOSOKAWA et al., 2007). Assim, os estudos mostram que algumas espécies de cupins e as baratas abrigam comunidades microbianas diversas e abundantes em seus intestinos que auxiliam a digestão de alimentos e na

ciclagem de nitrogênio realizada pelos seus hospedeiros (NAKAJIMA et al., 2005), enquanto que simbioses do intestino de percevejos de hematófagos fornecem nutrientes diretamente ao hospedeiro (BEARD; CORDON-ROSALES; DURVASULA, 2002).

Os simbioses intracelulares se dividem em dois grupos dependendo da coevolução com o hospedeiro. Os simbioses primários ou obrigatórios podem se localizar em células especializadas, os bacteriócitos, ou em órgão especializado, o bacterioma (Buchner 1965; THAO; BAUMANN, 2003). Esses simbioses são transmitidos maternalmente e a associação é necessária tanto para os insetos quanto para seus parceiros microbianos (DOUGLAS, 1998). Durante a evolução da associação obrigatória entre insetos e bactérias ocorreu a inativação e perda de genes dos simbioses, resultando em genomas reduzidos, característicos de bactérias que possuem associações obrigatórias com hospedeiros eucariotos (BAUMANN, 2005).

Os endocitobioses secundários não estão restritos aos bacteriócitos, mas encontram-se presentes em quase todos os tipos de células do inseto hospedeiro (RUAN; XU; LIU, 2006). Os simbioses secundários são diversos, mas não são de ocorrência obrigatória. A maioria desses microrganismos tem função desconhecida, mas não efetuam funções essenciais para a sobrevivência de seus hospedeiros (BAUMANN, 2005). Entretanto, quando presentes, podem influenciar diversos aspectos da bioecologia do hospedeiro, como por exemplo, a fecundidade, a longevidade, o modo de reprodução e a embriogênese, podendo, em casos extremos, até se tornar obrigatório para o sucesso reprodutivo do hospedeiro (OLIVER et al., 2003; TSUCHIDA; KOGA; FUKATSU, 2004; DEDEINE et al., 2004).

O simbiote que se estabelece em bacteriócitos apresenta papel nutricional nas espécies de insetos que se alimentam de dietas com fontes nutricionais incompletas, como os sugadores de seiva (afídeos, cigarras, cigarrinhas, cochonilhas, moscas-brancas e psílídeos) (BUCHNER, 1965; BAUMANN, 2005), sendo que a compensação das deficiências nutricionais da dieta desses insetos pelos simbioses ocorre pelo seu envolvimento em processos metabólicos, tais como a síntese de nutrientes essenciais e reciclagem de nitrogênio (BUCHNER, 1965; SASAKI; KAWAMURA; ISHIKAWA, 1996; BAUMANN, 2005).

Os bacteriócitos podem formar uma estrutura específica, chamada bacterioma, a qual apresenta certa variabilidade estrutural, sendo o mais comumente descrito formado por um grande sincício multinucleado delimitado por bacteriócitos uninucleados. O citoplasma dos bacteriócitos é preenchido pelo simbionte primário, enquanto que o sincício pode conter outro tipo de bactéria (BUCHNER, 1965; CHANG; MUSGRAVE, 1969; FUKATSU; NIKOH, 1998). Em alguns casos, é proposto que o simbionte do bacteriócito esteja em processo de substituição pelo simbionte do sincício, dada à redução extrema do seu genoma (MCCUTCHEON; MORAN, 2007).

O tratamento com antibióticos é um método comum no estudo das interações inseto-simbiontes visto à dificuldade ou impossibilidade de se cultivar os endossimbiontes fora de seus hospedeiros (WILKINSON, 1998). Esta técnica é importante porque tratamentos de insetos com antibióticos que removam seletivamente simbiontes secundários e/ou reduzam a quantidade de simbiontes primários podem demonstrar a natureza da relação de simbiose existente, produzindo efeitos benéficos ou prejudiciais ao desenvolvimento biológico de seus hospedeiros (RUAN; XU; LIU, 2006).

Desse modo, estudos realizados mostram que os efeitos de endossimbiontes primários e secundários na biologia de seus hospedeiros são variados. Dentre os benefícios que esses microrganismos podem prover estão: resistência a parasitoides (OLIVER et al., 2003) e doenças (MOREIRA et al., 2009), tolerância ao estresse térmico (MONTLLOR; MAXMEN; PURCELL, 2002) e a agrotóxicos (DURON et al., 2006; KONTSEDALOV et al., 2008), degradação de compostos secundários de plantas (SHEN; DOWD, 1990) e compensação da perda de endossimbiontes primários (KOGA; TSUCHIDA; FUKATSU, 2003).

Contudo, entre os mais variados efeitos que os simbiontes podem causar em insetos, se destacam: *i)* o papel de simbiontes no suprimento das necessidades nutricionais dos insetos, *ii)* a influência dos simbiontes no sistema de defesa e *iii)* as alterações induzidas pelos simbiontes nos processos reprodutivos do hospedeiro.

Quanto à nutrição, os simbiontes agem na compensação das deficiências nutricionais da dieta de alguns insetos, suprimindo o hospedeiro com nutrientes como aminoácidos essenciais e vitaminas, carentes em dietas desbalanceadas, como, por

exemplo, a seiva de plantas e o sangue de vertebrados, entre outros (DOUGLAS, 2009).

O sistema mais estudado é a interação entre afídeos (Hemiptera: Aphididae) e sua bactéria endossimbionte primária, *Buchnera aphidicola*. Neste caso, foi determinado que as vias metabólicas para a biossíntese de aminoácidos essenciais estão virtualmente intactas no genoma do simbiote, enquanto que aqueles para a síntese de aminoácidos não-essenciais estão quase que completamente ausentes. Assim, *Buchnera* provê o hospedeiro com aminoácidos essenciais ausentes da dieta do mesmo e obtêm os aminoácidos não-essenciais de seu hospedeiro (BAUMANN, 2005).

Os simbiossiontes podem ainda auxiliar no sistema de defesa dos insetos de várias formas, seja por meio de detoxificação, ativação de genes e rotas metabólicas do sistema imune, ou até mesmo competindo por recursos com microrganismos entomopatogênicos no interior das células (HAINE, 2008). A capacidade de detoxificação de xenobióticos por simbiossiontes foi inicialmente relatada no final da década de 80, quando a ausência do simbiote *Symbiotaphrina kochii* de *Lasioderma serricorne* (Fabricius, 1792) (Coleoptera: Anobiidae) foi relacionada à produção de insetos suscetíveis a compostos tóxicos (SHEN; DOWD, 1990). Já a área do conhecimento que explora a interação sistema imune – simbiote é mais recente e diversa, podendo ter como referência o simbiote, o qual produz um composto de defesa, ou o hospedeiro, o qual é induzido a produzir compostos ou a alterar rotas do sistema imune (WELCHMAN et al., 2009; WEISS; AKSOY, 2011; LOGIN ET AL., 2011).

Ainda há simbiossiontes que interferem no sistema reprodutivo do hospedeiro, influenciando a determinação do sexo ou inviabilizando o sucesso reprodutivo. Entre esses simbiossiontes, os mais estudados são as bactérias *Cardinium* (Filo Bacteroidetes, Classe Sphingobacteria, Flexibacteraceae), *Spiroplasma* (Filo Firmicutes, Classe Mollicutes, Spiroplasmataceae) e *Wolbachia* (Filo Proteobacteria, Classe α -Proteobacteria, Rickettsiaceae) (ENIGL; SCHAUSBERGER, 2007). A bactéria *Cardinium hertigii* recebeu outras designações antes de sua descrição formal, sendo relatada em inúmeros artigos como um organismo próximo a Cytophaga (“Cytophaga-like organism – CLO”) (HUNTER; PERLMAN; KELLY, 2003), bacteroidetes de *Encarsia* (“*Encarsia* bacteriodete – EB”) ou Cytophaga-Flexibacter-Bacteriodete de *Brevipalpus*

phoenicis (CFB-BP) (ZCHORI-FEIN et al., 2001), Essa bactéria é responsável por várias alterações na reprodução, tais como a indução de partenogênese, feminização, incompatibilidade citoplasmática e aumento da fecundidade (ZCHORI-FEIN et al., 2004). *Spiroplasma*, também designada como SRO (sex-ratio organisms), é associada exclusivamente à morte de machos (POULSON; SAKAGUCHI, 1961).

3.2.1.2 *Wolbachia*

Wolbachia é um simbiote citoplasmático comum a inúmeros invertebrados (STOUTHAMER; LUCK, 1993). *Wolbachia pipiens* foi descrita a partir do mosquito *Culex pipiens* Linnaeus, 1758 (Diptera: Culicidae), em 1936, por Hertig, sendo que a maioria das linhagens descritas subsequentemente tem sido associada a seus respectivos insetos hospedeiros (COOK; BUTCHER, 1999; WERREN, BALDO, CLARCK, 2008). Até os anos 70, poucos estudos se seguiram sobre esta bactéria, mas somente quando Yen & Barr (1971) descobriram que *W. pipiens* causava incompatibilidade em mosquitos quando ocorria o cruzamento de machos infectados com fêmeas sadias de *C. pipiens* é que os estudos sobre este simbiote se intensificaram (STOUTHAMER; BREEUWER; HURST, 1999).

O interesse por *Wolbachia* ocorre devido à sua ampla distribuição e efeitos nos hospedeiros. *Wolbachia* age como fator para processos evolutivos e atua como mecanismo de rápida especiação, visto a sua capacidade de alterar o desenvolvimento e os processos mitóticos em seus hospedeiros. Além disto, há o interesse na utilização desse simbiote em programas de controle biológico com parasitóides via a indução de telitoquia para aumentar os níveis de produção de inimigos naturais (STOUTHAMER, 1993), no desenvolvimento de técnicas de incompatibilidade em insetos (ZABALOU et al. 2004a, 2009), no combate a insetos vetores via redução da aptidão do hospedeiro ou de sua capacidade vetora (MCMENIMAN et al. 2009, KAMBRIS et al., L 2009) ou como vetor de modificações genéticas desejáveis nas populações de insetos (STOUTHAMER, 1993; DOBSON 2004; b et al., 2004; KAMBRIS et al., 2010; KLASSON et al. 2009; MCMENIMAN et al., 2009, ZABALOU et al., 2009).

No entanto, são necessários avanços na taxonomia do grupo, pois diferentes linhagens podem agir de maneira diversa. Frente às novas tecnologias para caracterização molecular de linhagens desse simbiote, discute-se a designação de *W.*

pipientis para todo o clado *Wolbachia* ou uma nomenclatura que considere diferentes espécies de *Wolbachia* (WERREN; BALDO; CLARK, 2008). Além dos dados moleculares, o que sustenta esta mudança na taxonomia são as diferentes associações que esta bactéria assume em relação aos hospedeiros, estabelecendo relações de parasitismo, comensalismo ou mutualismo (DEAN, 2006).

Atualmente, o clado *Wolbachia* é dividido em supergrupos, os quais são organizados em linhagens, dependendo do hospedeiro e do efeito induzido pelo simbiote. Os supergrupos de *Wolbachia* eram definidos com base nas sequências dos marcadores 16S do rRNA, *ftsZ* e *wsp*, resultando em oito supergrupos nomeados de A a H (LO et al., 2002). Contudo, em 2006 foi desenvolvido o método de tipagem pela análise de sequências de multilocos (“multilocus sequencing typing - MLST”), baseado em cinco genes (*gatB*, *coxA*, *hcpA*, *ftsZ* e *fbpA*), mais o gene *wsp* como marcador adicional. Esta abordagem levou ao reconhecimento de outros grupos de *Wolbachia*, resultando em 11 supergrupos, nomeados de A à K (BORDENSTEIN et al., 2009; ROS et al., 2009).

A tipagem por MLST oferece caracterização mais precisa das linhagens de *Wolbachia*, além de possibilitar estudos integrados de genética, distribuição geográfica e novos insetos hospedeiros (BALDO et al., 2006). No entanto, mantém-se a característica que todos os supergrupos de *Wolbachia* são monofiléticos quando comparados com outras Rickettsiales, sendo os supergrupos C e D comumente encontrados em nematoides (BAZZOCCHI et al., 2000), enquanto que os outros grupos estão distribuídos entre os artrópodes, com os supergrupos A e B sendo os mais comuns em insetos (WERREN; BALDO; CLARK, 2008).

De forma geral, *Wolbachia* manipula a reprodução do hospedeiro em favor de sua dispersão, fazendo com que haja maior produção de fêmeas infectadas. O efeito da associação com *Wolbachia* pode ser expresso pela indução da telitoquia, incompatibilidade citoplasmática, feminização e morte dos machos (WERREN, 1997), além de causar completa dependência para a produção de ovos em *Asobara tabida* (Nees, 1834) (Hymenoptera: Braconidae) (DEDEINE et al., 2001). Entretanto, novas vias de interação com o hospedeiro, não relacionadas a aspectos reprodutivos, foram recentemente descobertas. *Wolbachia* parece influenciar outras funções metabólicas do

hospedeiro ligadas à resposta olfativa (PENG et al., 2008), nutrição (suplementação de vitaminas do complexo B, metabolismo de ferro) (KREMER et al., 2009; HOSOKAWA et al., 2010) e resistência do hospedeiro a agrotóxicos (DURON et al., 2006). *Wolbachia* também afeta a relação do hospedeiro com outros organismos, induzindo maior resistência em *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) a infecções por vírus de RNA (RELMAN, 2008), inibição da replicação viral, disseminação e transmissão de DENV em *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), bem como a ação dos patógenos Chikungunya e *Plasmodium* (MOREIRA et al., 2009). A maior resistência do hospedeiro a patógenos e a diminuição da capacidade vetora dos mesmos estão associadas ao aumento da atividade imune do inseto devido à presença de *Wolbachia* (BIAN et al., 2010). *Wolbachia* também pode gerar variabilidade genética no hospedeiro a partir da transferência de seus genes, sendo que esta característica é vista como uma estratégia de controle alternativo por utilizar *Wolbachia* como vetor para transgênicos (KLASSON et al., 2009).

Contudo, a interferência no sistema de reprodução e, conseqüentemente, o seu efeito no crescimento populacional do hospedeiro, principalmente quando causado pela incompatibilidade citoplasmática, é a característica que mais desperta o interesse de pesquisadores para sua exploração como fonte alternativa para o controle de insetos-praga (ZABALOU et al., 2004b).

Incompatibilidade citoplasmática (IC) em insetos é normalmente causada quando machos infectados por *Wolbachia* encontram fêmeas não-infectadas ou quando ambos carregam o simbionte, mas de linhagens diferentes e incompatíveis entre si. Como a IC causa morte do embrião, fêmeas infectadas que estão protegidas de IC geralmente têm maior vantagem reprodutiva sobre fêmeas não-infectadas. Isto resulta em uma rápida dispersão da infecção pela população hospedeira, visto que *Wolbachia* é transmitida maternalmente (WEEKS et al., 2007).

Estudos anteriores indicaram grande variação nas linhagens de *Wolbachia* causadoras de IC (IC-*Wolbachia*) em hospedeiros naturais. Assim, um hospedeiro pode carregar múltiplas linhagens de IC-*Wolbachia* mutuamente incompatíveis (PERROT-MINNOT; GUO; WERREN, 1996). A complexidade da interação entre linhagens de IC-*Wolbachia* com outros simbiontes gera fenótipos inesperados, sendo registrada a

compatibilidade em casos teoricamente incompatíveis, como entre linhagens diferentes ou na ausência do simbiote no macho (ZABALOU et al., 2004a; PERLMAN et al., 2006).

O mecanismo de indução de IC difere para espécies diploides e haplodiploides. No primeiro grupo, IC é expressa pela mortalidade dos embriões, sendo que o mecanismo molecular envolvido ainda não foi elucidado. No entanto, dados sugerem que *Wolbachia* modifica os componentes nucleares do espermatozoide durante a espermatogênese (PRESGRAVES, 2000), o que é chamado de ação de modificação de *Wolbachia* (função mod) (WERREN, 1997). Esta modificação previne que todos os cromossomos paternos entrem na anáfase durante a primeira divisão mitótica, ocasionando falhas no desenvolvimento do zigoto, a menos que linhagem compatível de *Wolbachia* esteja presente no ovo e exerça a função de resgate (função resc) (ZABALOU et al., 2008).

Para espécies haplodiploides, duas formas de incompatibilidade citoplasmática são relatadas: (a) mortalidade de fêmeas e (b) conversão de machos. No primeiro tipo, os embriões de ovos fertilizados morrem. Desta forma, somente os ovos não-fertilizados darão origem a adultos, os quais serão exclusivamente machos. No segundo caso, os cromossomos paternos e incompatíveis são destruídos, resultando no desenvolvimento de machos haploides a partir de ovos fertilizados. Esta conversão de embriões em machos reduz substancialmente a razão sexual da população, visto que nesta situação, machos passam a ser produzidos de ovos fertilizados e não-fertilizados (PERLMAN et al., 2006).

A interação *Wolbachia*-hospedeiro é variável principalmente em relação à intensidade de incompatibilidade, que, por exemplo, pode ser perdida com a idade do inseto (STAHLHUT et al., 2010). Com isto, alguns fatores são importantes para determinar as propriedades da incompatibilidade citoplasmática, como a correta definição da linhagem, o genoma nuclear do hospedeiro e a origem da linhagem apossimbiote, se natural ou se gerada por tratamentos com antibióticos (WEEKS et al., 2002).

As linhagens de *Wolbachia* que causam telitoquia, feminização e morte de machos (MM) também alteram a razão sexual do hospedeiro. A indução da telitoquia

parece ser mais comum em insetos haplodiploides, os quais, quando infectados, produzem progênie formada unicamente por fêmeas (TAGAMI; MIURA; STOUTHAMER, 2001). Linhagens de *Wolbachia* indutoras de feminização agem suprimindo glândulas androgênicas, tornando machos em fêmeas competentes à reprodução (WEREN, 1997). Já as linhagens indutoras de morte de machos, tipicamente eliminam o macho enquanto embrião, sendo que a viabilidade de ovos produzidos por fêmeas infectadas corresponde à metade daquela de fêmeas não-infectadas (DYER; JAENIKE, 2004; HORNETT et al., 2006). A morte de embriões machos é ideal para a dispersão de *Wolbachia*, baseando-se no fato que reduz a competição (JAENIKE, 2007).

Ainda, as alterações induzidas por *Wolbachia* são dependentes de vários fatores, tais como a localização da bactéria nos diferentes tecidos do hospedeiro e a intensidade de infecção. *Wolbachia* se distribui por tecidos reprodutivos e somáticos em diferentes densidades, sendo influenciada pela espécie e fase de desenvolvimento do hospedeiro (BROWNLIE et al., 2007). Esses fatores podem agir restringindo ou modulando a expressão de um determinado fenótipo, o que também pode ocorrer devido à influência do genoma do hospedeiro (WEEKS et al., 2002).

3.2.1.3 Interação entre simbiossiontes herdados e o DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial é muito utilizado como marcador genético em várias populações para elucidar questões de biogeografia, evolução e taxonomia (HEBERT; GREGORY, 2005). Diversas características tornam esse marcador interessante, visto a facilidade de amplificação dessa região para várias taxa distintos, a desnecessidade de clonagem, possibilidade de recuperação de padrões e tempos recentes de eventos históricos e ocorrência de baixa taxa de recombinação (HURST; JIGGINS, 2005).

Contudo, existem alguns problemas na utilização do DNA mitocondrial como única ferramenta de estudo por ser uma molécula de herança materna, pois os padrões observados poderiam não refletir a história evolutiva da espécie, mas sim apenas aquela das fêmeas (BENSASSON et al, 2001). Ainda, Ballard & Whitlock (2004) argumentaram que o DNA mitocondrial não sofre seleção neutra, pois pode ocorrer

seleção direta na molécula do DNA mitocondrial ou seleção indireta por meio de desequilíbrio de ligação causado por outros genes herdados maternalmente.

Como já mencionado, o filo Arthropoda apresenta grande número de interações com diversos simbioss, sendo que alguns deles são transmitidos de modo vertical e causam alterações na razão sexual ou aumentam a fecundidade de fêmeas que carregam o simbiote. Desse modo, se um simbiote específico aumenta a dispersão dos indivíduos que o carregam, o mesmo estará indiretamente favorecendo um determinado haplótipo. Esse processo foi analisado em experimentos de laboratório com *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) infectado com linhagem IC-*Wolbachia* (KAMBHAMPATI; RAI; VERLEYE, 1992).

Entretanto, o caso mais marcante da influência do simbiote na herança mitocondrial ocorreu na população natural da Califórnia de *Drosophila simulans* Sturtevant, 1919 (Diptera: Drosophilidae). Esta mosca não apresentava *Wolbachia* até meados de 1980, quando adquiriu uma linhagem indutora de incompatibilidade citoplasmática (TURELLI; HOFFMANN, 1991). A população infectada tinha maior aptidão biológica e se expandiu rapidamente, carregando consigo um haplótipo antes raro ou ausente nas populações não-infectadas. Uma vez que a infecção se aproximou da fixação, o haplótipo original foi substituído pelo(s) haplótipo(s) associado(s) ao simbiote (TURELLI; HOFFMANN; McKECHNIE, 1992).

Vários estudos posteriores mostraram que a troca na frequência de haplótipos observada em *D. simulans* é comum em insetos e leva à redução na variabilidade genética em populações infectadas (BALLARD; KREITMAN, 1994; MARCADE et al., 1999; BALLARD, 2000; SCHULENBURG et al., 2002; DEAN et al., 2003; JIGGINS, 2003; DYER; JAENIKE, 2004; BALDO et al., 2008; NUNES; NOLTE; SCHLOTTERER, 2008; CHARLAT et al., 2009; RODRIGUERO; LANTERI; CONFALONIERI, 2010). No entanto, há casos em que não existe relação entre o DNA mitocondrial do hospedeiro e o simbiote (SHOEMAKER et al., 2000; SHOEMAKER; KELLER; ROSS, 2003; MARSHALL, 2004; KELLER et al., 2004; AHRENS; SHOEMAKER, 2005; MOUNTON; HENRI; FLEURY, 2009).

Nos casos em que o simbiote infecta uma população sadia e guia a evolução haplotípica, a diversidade genética da população pode sofrer várias alterações quando

se considera a ocorrência de mais de uma linhagem ou simbiote infectando o mesmo indivíduo. Assim, apesar da diversidade genética ser menor devido ao simbiote, ao observar a população no geral, é possível encontrar alta diversidade genética dada à diversidade de linhagens e simbiotes presentes (HURST; JIGGINS, 2005).

Uma vez que o simbiote é fixado na população, o DNA mitocondrial associado poderia acumular mutações e retornar a um padrão polimórfico neutro; porém, dos casos estudados, apenas dois apresentaram esse padrão (JIGGINS; HURST; YANG, 2002). Entre as razões do porquê o padrão mitocondrial não retornou ao normal está uma seleção direcionada, em que as mutações adquiridas só seriam fixadas se aumentassem a aptidão do simbiote ou o tamanho efetivo populacional do DNA mitocondrial, que é menor depois da infecção (JIGGINS; HURST; YANG, 2002).

A estrutura populacional também pode ser influenciada pelo simbiote, visto que a migração de um indivíduo infectado para uma população não-infectada pode causar homogeneização do DNA mitocondrial, o que causaria confusão entre duas populações distintas. O oposto também pode acontecer, sendo que uma mesma população que apresenta simbiotes ou linhagens distintas pode apresentar DNA mitocondrial diferente em relação aos simbiotes, sendo a população considerada heterógena. Essas confusões podem ser resolvidas com a análise do DNA nuclear (KAMBHAMPATI; RAI; VERLEYE, 1992; LACHAISE et al, 2000; BIRUNGI; MUNSTERMANN, 2002; BAUDRY et al., 2003; ARMBRUSTER et al., 2003).

3.2.2 Material e métodos

3.2.2.1 Coleta e manipulação de populações

Amostras de populações de *D. citri* foram coletadas em diferentes regiões, principalmente do estado de São Paulo (Tabela 3.1). Amostras de cada população consistiram de subamostragens de psílídeos em brotações novas de diversas plantas de citros ou murta. Os espécimes foram imediatamente fixados em 100% etanol para posterior extração do DNA genômico. Foram selecionados 10 indivíduos de cada população para extração do material genético para as avaliações moleculares quanto à ocorrência e caracterização de *Wolbachia*.

3.2.2.2 Extração do DNA genômico

Os espécimes foram removidos do etanol, colocados no interior de tubos de 1,5 ml e mantidos à temperatura ambiente para a completa evaporação do etanol. Após a secagem, foram adicionados 100 µl do tampão de extração TEN (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA, pH 8,0; 400 mM NaCl), acrescido de 40 µl SDS a 20% e 8 µl de proteinase-K a 20 mg/ml. O material foi macerado com auxílio de pistilo e incubado a 55°C por 1 h. Após este período, 300 µl de solução aquosa saturada de cloreto de sódio (5 M NaCl) foram adicionados, a amostra foi agitada vigorosamente em vórtex por 30 s, centrifugada a 14,000 g (30 min a 25°C), e o sobrenadante coletado. Um volume de isopropanol gelado foi adicionado ao sobrenadante para a precipitação do DNA após incubação a -20°C por uma noite. O material foi então centrifugado (14.000 g x 20 min a 4°C), o sobrenadante descartado e o pellet de DNA lavado em banhos sucessivos de etanol a 100% (1x) e 70% (2x), e centrifugado a 14.000 g por 10 min a 4°C. Ao término das lavagens, o pellet de DNA foi mantido à temperatura ambiente para completa evaporação do etanol, ressuspenso em 20 µl de água Milli-Q autoclavada e armazenado a -20°C até sua utilização. A integridade do DNA extraído foi avaliada via eletroforese em gel de agarose a 1% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio, em tampão tris-acetato-EDTA (1x TAE) (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA; pH = 7,2) a 5 V/cm, e posterior visualização em transiluminador (SUNNUCKS; HALES, 1996).

3.2.2.3 Determinação da frequência natural de infecção de *Diaphorina citri* por *Wolbachia*

A frequência de ocorrência de *Wolbachia* em populações naturais de *D. citri* foi avaliada pela amplificação de fragmento específico em reação de PCR programada a 94°C por 2 min (1 ciclo); 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min (35 ciclos), seguido de extensão final a 72°C por 5 min, utilizando como substrato de amplificação o DNA genômico obtido dos espécimes extraído como descrito anteriormente. Assim, foram avaliados 10 indivíduos para cada população de *D. citri* estudada, exceto para aquelas populações em que um número menor de indivíduos foi coletado (Tabela 3.1). As reações foram feitas em volume total de 25 µl contendo 1-10 ng de gDNA, 1x

tampão de PCR, 1,5 mM MgCl₂ , 200 µM de cada dNTP, 0,32 µMol de cada iniciador e 0,5 U de Taq polimerase.

Nas reações de PCR utilizaram-se os iniciadores *wsp81F*: 5' TGG TAC AAT AAG TGA TGA AGA AAC 3' e *wsp691R*: 5' AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA 3' (BRAIG et al., 1998). Os produtos de amplificação foram visualizados em transiluminador após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio, em tampão 1x TAE, para a confirmação da ocorrência de *Wolbachia*. Reações PCR-negativo foram submetidas ao PCR aninhado para se certificar da inexistência de infecção, evitando-se os casos em que a baixa densidade da bactéria produz falsos negativos. Assim, os iniciadores *wsp106F* (5' GGA TAG TCC CTT AAC AAG AT 3') e *wsp460r* (5' TTG ATT TCT GGA GTT ACA TC 3'), internos ao *wsp81F/wsp691R*, foram desenhados e utilizados em reações de amplificação programada a 94°C por 2 min (1 ciclo); 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min (35 ciclos), seguido de extensão final a 72°C por 5 min. As reações foram feitas em volume total de 25 µl, contendo 1 µl do produto da reação de PCR com os iniciadores *wsp81F/wsp691R*, 1x tampão de PCR, 1,5 mM MgCl₂ , 200 µM cada dNTP, 0,32 µMol de cada iniciador e 0,5 U de Taq polimerase. Os produtos de amplificação foram visualizados em transiluminador após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio, em tampão 1x TAE, para a confirmação da ocorrência de *Wolbachia* nas amostras anteriormente classificadas como negativas.

O produto de amplificação obtido em um indivíduo de cada população foi posteriormente purificado com o método enzimático ExoSap (Fermentas), seguindo as recomendações do fabricante, e enviado ao “Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética” (CEBMG), UNICAMP, para sequenciamento bidirecional com os iniciadores *wsp81F* e *wsp691R*.

Tabela 3.1 – Origem, data de coleta, hospedeiro e número de indivíduos amostrados das populações de *Diaphorina citri* analisadas

(continua)

Origem	Data de coleta	Planta	Coletor	Nº de ind.
Brasil –MG				
Divinópolis	31.x.2010	Citros	A.J. F. Diniz	9
Brasil –MS				
Três Lagoas	31.i.2010	Murta	R.H.da Silva	5
Brasil –PR				
Maringá	20.iv.2009	Citros	F.C.A. Dossi	10
Brasil –SP				
Araraquara	01.iii.2005	Murta	Fundecitrus	10
Bandeirantes D' Oeste	23.x.2008	Murta	A. Lahoz	10
Barretos	27.x.2009	Murta	M. Miranda	9
Bebedouro	20.viii.2010	Murta	A.S. Poltronieri	10
Botucatu	01.iii.2005	Citros	Fundecitrus	5
Cafelândia	01.iii.2005	Citros	Fundecitrus	5
Cardoso	28.x.2009	Murta	M. Miranda	10
Casa Branca	01.iii.2005	Citros	Fundecitrus	5
Cerqueira César	10.x.2008	Citros	A. Lahoz	10
Espírito Santo do Turvo	15.ix.2008	Citros	A. Lahoz	10
Guarantã	01.iii.2005	Citros	Fundecitrus	5
Itapetininga	01.xii.2008	Citros	A. Lahoz	10
Itirapina	01.iii.2005	Citros	Fundecitrus	5
Jaboticabal	01.v.2008	Citros	F.L. Cônsoli	10
Mogi Mirim	21.viii.2010	Murta	A.S. Poltronieri	10
Monte Alto	17.x.2009	Murta	M. Miranda	10
Nova Granada	23.xi.2009	Citros	R.A. Thomazini	10

Tabela 3.1 – Origem, data de coleta, hospedeiro e número de indivíduos amostrados das populações de *Diaphorina citri* analisadas

				(conclusão)
Origem	Data de coleta	Planta	Coletor	Nº de ind.
Novo Horizonte	05.xi.2009	Citros	M. Miranda	10
Palestina	11.xii.2009	Murta	R.A. Thomazini	10
Palmeira D'Oeste	07.x.2009	Murta	M. Miranda	10
Penápolis	02.xii.2009	Murta	Fundecitrus	10
Piracicaba	19.xi.2008	Murta	A.S. Guidolin	10
Pongai	01.iii.2005	Citros	Fundecitrus	5
Potirendaba	01.xii.2009	Murta	R. A. Thomazini	10
Regianópolis	26.ix.2008	Citros	A. Lahoz	10
Ribeirão Preto	24.xii.2008	Murta	F. L. Cônsoli	10
Sales	22.x.2009	Citros	M. Miranda	8
Santa Cruz da Conceição	02.xii.2009	Citros	Fundecitrus	10
Santa Fé do Sul	01.iii.2005	Citros	Fundecitrus	10
São Carlos	01.iii.2005	Citros	Fundecitrus	5
Sud Mennucci	23.x.2008	Murta	A. Lahoz	10
Três Fronteiras	16.x.2009	Murta	M. Miranda	10
Urupês	21.x.2009	Citros	M. Miranda	10
Brasil -RR Boa Vista	19.vi.2009	Murta	A. Massapo	10
Palestina	11.xii.2009	Murta	R.A. Thomazini	10
Palmeira D'Oeste	07.x.2009	Murta	M. Miranda	10

3.2.2.4 Determinação do Supergrupo de *Wolbachia*

Um indivíduo positivo para *Wolbachia* de cada população estudada foi testado para os supergrupos A e B de *Wolbachia* utilizando-se de PCRs diagnósticos com os iniciadores específicos para *Wolbachia* supergrupo A (*wsp*136F: 5' TGA AAT TTT ACC

TCT TTT C 3' e *wsp691R*: 5' AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA 3') e *Wolbachia* supergrupo B (*wsp81F*: 5' TGG TAC AAT AAG TGA TGA AGA AAC 3' e *wsp522R*: 5' ACC AGC TTT TGC TTG ATA 3'). O termociclador foi programado a 94°C por 2 min (1 ciclo); 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min (35 ciclos), seguido de extensão final a 72°C por 5 min. As reações foram feitas em volume total de 25 µl, contendo 1-10 ng de gDNA, 1x PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM cada dNTP, 0,32 µMol de cada iniciador e 0,5 U de Taq polimerase. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose a 1,5%, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio, em tampão 1x TAE, e visualizados em transiluminador UV.

3.2.2.5 Caracterização da linhagem de *Wolbachia* por meio da técnica de MLST

As amplificações de PCR para tipagem da linhagem de *Wolbachia* associada aos psilídeos das diversas populações amostradas seguiram o protocolo estabelecido por Baldo et al. (2006), sendo utilizados os iniciadores específicos de MLST para os genes *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *ftsZ* e *fbpA* (Tabela 3.2). Inicialmente, a tipagem por MLST foi realizada com um indivíduo por população, o mesmo sequenciado com os iniciadores *wsp*. As reações foram feitas em volume total de 25 µl, contendo 1-10 ng de gDNA, 1x PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM cada dNTP, 0,32 µMol de cada iniciador e 0,5 U de Taq polimerase. O termociclador foi programado a 94°C por 2 min (1 ciclo), 36 ciclos a 94°C por 30 s, x°C por 45s (x dependendo do iniciador – Tabela 3.2) e 72°C por 1,5 min e extensão final a 70°C por 10 min. Os produtos de amplificação foram visualizados em transiluminador após resolução do produto de amplificação em gel de agarose a 1,5%, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio, em tampão 1x TAE. Os amplicons de reações positivas foram posteriormente purificados com o método enzimático ExoSap (Fermentas), segundo as informações do fabricante, e enviados para sequenciamento bidirecional no “Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética” (CEBMG), UNICAMP.

Considerando os dados prévios de diversidade do simbiote obtidos com as análises acima descritas, os genes *ftsZ* e *hcpA* foram selecionados para sequenciar todos os indivíduos das populações de Araraquara, Barretos, Botucatu, Espírito Santo do Turvo, Itapetininga, Mogi Mirim, Palestina, Palmeiras D'Oeste, Penápolis, Ribeirão Preto, Santa Cruz da Conceição e Santa Fé do Sul, todas do estado de São Paulo,

além de Maringá (PR) e Três Lagoas (MS). Estas cidades representam as diferentes regiões do estado de São Paulo e os diferentes grupos populacionais de *D. citri* definidos no capítulo anterior, além de populações que apresentaram sequências-tipo de *Wolbachia* distintas daquela mais frequente. Todas as amostras foram enviadas para sequenciamento no “Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética” (CEBMG), UNICAMP.

Tabela 3.2 – Marcadores moleculares, iniciadores e temperaturas de anelamento utilizados para a caracterização molecular de linhagens de *Wolbachia* associadas às populações naturais de *Diaphorina citri* via MLST (BALDO et al., 2006)

Gene	Nome	Sequência	Anelamento (°C)
<i>gatB</i>	gatB_F1	GAKTTAAAYCGYGCAGGBGTT	54°C
	gatB_R1	TGGYAAAYTCRGGYAAAGATGA	
<i>coxA</i>	coxA_F1	TTGGRGCRATYAACTTTATAG	55°C
	coxA_R1	CTAAAGACTTTKACRCCAGT	
<i>hcpA</i>	hcpA_F1	GAAATARCAGTTGCTGCAAA	53°C
	hcpA_R1	GAAAGTYRAGCAAGYTCTG	
<i>ftsZ</i>	ftsZ_F1	ATYATGGARCATATAAARGATAG	54°C
	ftsZ_R1	TCRAGYAATGATTRGATAT	
<i>fbpA</i>	fbpA_F1	GCTGCTCCRCTTGGYWTGAT	59°C
	fbpA_R1	CCRCCAGARAAAAYYACTATTC	

3.2.2.6 Análises das sequências obtidas por MLST e do gene *wsp*

Para as análises via MLST, as cinco sequências referentes a cada gene foram comparadas isoladamente com as sequências depositadas no banco de dados específico para MLST de *Wolbachia* (<http://pubmlst.org/wolbachia/>), para a verificação da combinação alélica a definir os STs presentes nos indivíduos e populações analisadas.

Já as sequências do gene *wsp* foram visualizadas no programa FinchTV v.1.4.0 (Geospiza Inc.) e alinhadas com auxílio da ferramenta ClustalW no programa Mega

5.05, utilizando os parâmetros padrão (penalidade de “gap” = 15, extensão de “gap” = 9) (TAMURA et al., 2011). Posteriormente, todas as sequências foram analisadas junto ao banco de dados de *wsp* (<http://pubmlst.org/wolbachia/wsp/>) para a definição das regiões hipervariáveis (HVRs), as quais foram propostas para caracterização das linhagens de *Wolbachia* (BALDO; LO; WERREN, 2005). O *wsp* de amostras oriundas da Flórida e do Uruguai foi caracterizado e incluso nas análises para se estabelecer as relações existentes entre as amostras do Brasil.

3.2.2.7 Análises filogenéticas

A partir do banco de dados de MLST foram selecionadas sequências concatenadas de STs próximos que apresentavam informações disponíveis sobre o hospedeiro (Tabela 3.3A), visando à análise de proximidade junto aos STs isolados de *D. citri* no Brasil. Em relação ao gene *wsp*, inúmeras sequências que dão origem a grupos definidos foram selecionadas do banco de dados do NCBI (Tabela 3.3B), e analisadas conjuntamente com aquelas obtidas neste trabalho.

Em ambos os conjuntos de dados, as sequências foram alinhadas com auxílio da ferramenta ClustalW e editadas manualmente. As análises filogenéticas utilizaram a abordagem bayesiana, disponível no programa Beast 1.6.1 (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007), e a de distância, disponível no programa Mega 5.05.

Assim, nas análises bayesianas as genealogias foram amostradas a cada 10.000 iterações em corridas de 10 milhões de gerações com 10% das amostras iniciais descartadas como aquecimento das cadeias (“burn-in”), sendo que a análise baseada nos genes do MLST utilizou o modelo HKY+G+I, com $G = 0,52$ e $I = 0,61$, enquanto aquela baseada no *wsp* empregou valores de $G = 2,35$ e de $I = 0,39$. Os modelos evolutivos foram definidos no programa Mega 5.05, segundo o critério de menor valor para BIC (“Bayesian Information Criterion”) e AIC (“Akaike Information Criterion”). A árvore filogenética foi gerada no programa TreeAnnotator a partir do modelo de coalescência com crescimento constante, considerando a média das estimativas, bem como o limite de 95% de maior densidade posterior (HPD) e a probabilidade posterior maior que 80% em cada clado.

Na análise baseada na distância genética, a relação filogenética foi inferida com o método Neighbor-Joining, utilizando o modelo de distância p com 1000 repetições, disponível no programa Mega 5.05. Todas as árvores foram visualizadas e editadas no programa FigTree 1.3.1.

3.2.2.8 Amplificação e sequenciamento do DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial das populações descritas no item 3.2.2.5 foi amplificado utilizando uma região do gene da *citocromo oxidase I* (COI). As reações foram feitas em volume total de 25 μ l, contendo 1-10 ng de gDNA, 1x PCR buffer, 1,5 mM $MgCl_2$, 200 μ M cada dNTP, 0,32 μ Mol de cada iniciador (DcitriCOIL: 5' AGG AGG TGG AGA CCC AAT CT 3', DcitriCOLr: 5' TCA ATT GGG GGA GAG TTT TG 3') e 0,5 U de Taq polimerase. As reações foram programadas a 92°C por 5 min (1 ciclo), 35 ciclos a 92°C por 1min, 53°C por 1 min e 72°C por 1,5min e extensão final a 70°C por 10 min.

Os produtos de amplificação foram visualizados em transiluminador após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo 0,5 μ g/ml de brometo de etídio, em tampão 1X TAE. Amplicons de tamanho esperado foram posteriormente purificados e enviados para sequenciamento bidirecional no “Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética” (CEBMG), UNICAMP.

3.2.2.9 Análise de diversidade genética de *Diaphorina citri* associada a *Wolbachia*

As análises de diversidade genética de *D. citri* foram feitas no programa Arlequin v 3.5.1.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010), no qual foram calculadas as diversidades haplotípicas e nucleotídicas para cada população e definidos os haplótipos. Assim, foi possível comparar a distribuição das linhagens de *Wolbachia* entre os haplótipos de *D. citri* e a influência do simbiote na diversidade genética desse hospedeiro.

Tabela 3.3 - Identificação das sequências provenientes dos bancos de dados de MLST (A) e *wsp* (B) para as análises genéticas com as sequências obtidas para as diferentes *Wolbachia* associadas às populações de *Diaphorina citri* no Brasil

(continua)

ST	Hospedeiro	Supergrupo
4	<i>Acraea eponina</i> (Cramer, 1780) (Lepidoptera: Nymphalidae)	B
5	<i>Acromis sparsa</i> Blackwelder, 1946 (Coleoptera: Chrysomelidae)	A
7	<i>Chelymorpha alternans</i> (Boheman, 1854) (Coleoptera: Chrysomelidae)	B
18	<i>Encarsia formosa</i> Gahan, 1924 (Hymenoptera: Aphelinidae)	B
21	<i>Gryllus firmus</i> Scudder, 1902 (Orthoptera: Gryllidae)	B
26	<i>Nasonia vitripennis</i> Walker, 1836 (Hymenoptera: Pteromalidae)	B
27	<i>Ostrinia scapularis</i> (Walker, 1859) (Lepidoptera: Crambide)	B
30	<i>Tribolium confusum</i> Jaquelin Du Val, 1868 (Coleoptera: Tenebrionidae)	B
32	<i>Teleogryllus taiwanemma</i> (Ohmachi & Matsuura 1951) (Orthoptera: Gryllidae)	B
36	<i>Lycaeides idas</i> (Masters 1972) (Lepidoptera: Lycaenidae)	B
37	<i>Tetrastichus coeruleus</i> (Nees, 1834) (Hymenoptera: Eulophidae)	B
39	<i>Horaga onyx</i> (Moore, 1857) (Lepidoptera: Lycaenidae)	B
40	<i>Eurema mandarina</i> (de l'Orza, 1869) (Lepidoptera: Pieridae)	B
98	<i>Drosophila innubila</i> Spencer, 1943 (Diptera: Drosophilidae)	B
103	<i>Polybia sp.</i> Lepeletier, 1835 (Hymenoptera: Vespidae)	B

B)

Grupo	Hospedeiro	Supergrupo	Linhagem	n° de acesso
-	<i>Diaphorina citri</i> ¹ (Hemiptera: Psyllidae)	B	wCitri	GQ385975
-	<i>Diaphorina citri</i> ² (Hemiptera: Psyllidae)	B	wCitri	GQ385974
-	<i>Diaphorina citri</i> ³ (Hemiptera: Psyllidae)	B	-	GU480070
Bal	<i>Balclutha sp.</i> Kirkaldy 1900 (Hemiptera: Cicadellidae)	B	-	AF481172
Btom1	<i>Byturus tomentosus</i> De Geer, 1774 (Coleoptera: Byturidae)	B	-	AJ585376
	<i>Byturus unicolor</i> Say, 1823 (Coleoptera: Byturidae)	B	-	AJ585378
Com	<i>Diaphorina citri</i> (Hemiptera: Psyllidae)	B	wCit-B1	AF217721

Tabela 3.3 - Identificação das sequências provenientes dos bancos de dados de MLST (A) e *wsp* (B) para as análises genéticas com as sequências obtidas para as diferentes *Wolbachia* associadas às populações de *Diaphorina citri* no Brasil

(conclusão)				
Grupo	Hospedeiro	Supergrupo	Linhagem	n° de acesso
Diacir2	<i>Frankliniopsis vespiformis</i> (D. L. Crawford, 1909) (Thysanoptera: Aeolothripidae)	B	-	AB045314
	<i>Haematopinus suis</i> Linhagem (Linnaeus, 1758) (Phthiraptera: Anoplura)	B	wPol2	AY596786
	<i>Laodelphax striatellus</i> (Fallén 1826) (Hemiptera: Delphacidae)	B	wStri	AF020080
	<i>Tribolium confusum</i> (Coleoptera: Tenebrionidae)	B	wCon	AF020083
	<i>Angiostrongylus cantonensis</i> (Chen, 1935) (Secernente: Strongylida: Metastrongylidae)	B	-	AY508981
	<i>Diaea circumlita</i> (Arachnida, Araneae: Thomisidae)	B	wDiacir2	AY486092
	<i>Melittobia digitata</i> Dahms, 1984 (Hymenoptera: Eulophidae)	B	wDig	EF564624
For	<i>Encarsia formosa</i> (Hymenoptera: Aphelinidae)	B	wFor	AF071819
Mic	<i>Nilaparvata bakeri</i> (Hemiptera: Delphacidae)	B	wBak	AF481180
	<i>Gronotoma micromorpha</i> (Hymenoptera: Eucilidae)	B	-	AB037895
Ori	<i>Eretmocerus stufferi</i> (Hymenoptera: Chalcidoidea)	B	wSta	AF071919
Pip	<i>Tagosodes orizicolus</i> (Muir, 1926) (Hemiptera: Delphacidae)	B	wOri	AF020085
	<i>Culex pipiens</i> (Diptera: Culicidae)	B	wPip	AF020061

Números sobrescritos indicam populações coletadas em diferentes regiões da China: 1- Shenzhen, 2- Beihai, 3- Liuzhou.

3.2.3 Resultados

A amplificação do gene *wsp* indicou a ocorrência de *Wolbachia* em todas as populações, com taxa de infecção de 100%, indicando que a infecção está fixa nas populações de *D. citri* no Brasil (dados não-apresentados). No entanto, a infecção em vários dos indivíduos só foi detectada após PCR aninhado, sugerindo que a densidade da bactéria por hospedeiro pode ser bastante variável entre e dentro das diferentes populações analisadas. Com relação aos supergrupos, PCRs diagnósticos confirmaram a ocorrência apenas do supergrupo B de *Wolbachia* (dados não-apresentados).

As análises por MLST revelaram cinco sequências-tipo (ST) distintas e novas, as quais foram caracterizadas pela descrição de dois a três novos alelos para o conjunto utilizado na tipagem multilocus de *Wolbachia*, sendo os genes *gatB* e *ftsZ* os que produziram o maior número de alelos novos (3) entre os genes analisados, enquanto o gene *fbpA* resultou em um alelo único (Tabela 3.4). Assim, a caracterização das linhagens de *Wolbachia* associadas a *D. citri* neste trabalho levou à descrição de 10 novos alelos e a definição de cinco STs (ST-173, ST-174, ST-175, ST-225 e ST-236) ainda sem qualquer associação hospedeira definida, levando-se em consideração as informações disponíveis no banco de dados de MLST de *Wolbachia* (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 - Composição alélica dos STs de *Wolbachia* associados às diferentes populações de *Diaphorina citri* no Brasil

ST	173	174	175	225	236
<i>gatB</i>	109*	9	109*	140*	167*
<i>coxA</i>	86*	91*	86*	66	91
<i>ftsZ</i>	81*	15	126*	112*	126
<i>hcpA</i>	29	109*	88	29	170*
<i>fbpA</i>	27	27	27	27	27

* Alelos novos definidos neste trabalho

A distribuição dessas sequências-tipo em *D. citri* foi marcada pela predominância do ST-173 infectando indivíduos em todas as populações estudadas, sendo os demais STs de ocorrência mais restrita a populações específicas, quase sempre associados a indivíduos únicos. Assim, o ST-174 foi restrito à população de Itapetininga (SP), enquanto que os STs-175 e 236 ocorreram apenas na população de Maringá-PR. O ST-

173 só não predominou na população de Três Lagoas (MS), onde o ST-225 se mostrou como o mais frequente, apesar do reduzido número de indivíduos analisados (3 indivíduos infectados pelo ST-225 vs. 2 indivíduos infectados pelo ST-173) (Figura 3.1). Apesar da ocorrência dos diferentes STs de *Wolbachia* nas diversas populações de *D. citri* analisadas, não foi detectada a ocorrência de indivíduos que apresentassem infecção múltipla, ou seja, que estivessem infectados por mais de um (1) ST de *Wolbachia*, mesmo com a presença de múltiplos STs em algumas populações.

A análise das regiões hipervariáveis (HVRs) do gene *wsp* não permitiu a diferenciação dos STs-173 e 175, os quais apresentaram HVRs idênticas, se mostrando menos sensível a pequenas variações do que a análise por MLST. No entanto, os demais STs apresentaram HVRs próprias, sustentando a diversidade apresentada pelo MLST. Ainda, as HVRs determinadas para as sequências de *wsp* obtidas de psílídeos da Flórida-EUA foram idênticas àquela dos STs-173/175, enquanto a sequência do Uruguai apresentou padrão diferente das sequências brasileiras, sugerindo que esta população possa apresentar um ST de *Wolbachia* distinto a ela associado (Tabela 3.5).

As análises filogenéticas das sequências concatenadas dos marcadores moleculares utilizados na caracterização de *Wolbachia* via MLST resultaram em árvores filogenéticas com topologias muito próximas, diferindo principalmente no nível de colocação do ST-225 (Figura 3.2AB). Ambas as análises resultaram na formação de um clado distinto para os STs caracterizados em *D. citri*, o qual também incluiu os STs-98 e 103, associados, respectivamente, a *Polybia* sp. e *D. innubila* (Figura 3.2 AB). Os STs definidos neste trabalho se separaram em três grupos distintos, com os STs-173 e 175 e STs-174 e 236 formando grupos próprios, independentemente do método de análise utilizado, se bayesiano (Figura 3.2A) ou de distância (Figura 3.2B), todos com alta sustentação. O terceiro grupo, representado exclusivamente pelo ST-225, que, juntamente com o ST-103 de *Polybia* sp., ora se coloca em um ramo mais interno no clado (análise bayesiana – Figura 3.2A), ora no ramo externo do clado (análise por distância – Figura 3.2B).

Figura 3.1 – Distribuição relativa da associação das sequências-tipo (STs) de *Wolbachia* associadas às diferentes populações de *Diaphorina citri* analisadas

Tabela 3.5 - Composição alélica do gene *wsp* e das quatro regiões hipervariáveis (HVR) de *Wolbachia* associadas às diferentes populações de *Diaphorina citri* no Brasil, Estados Unidos e Uruguai

Alelos	ST-173, ST -175 EUA (Flórida)	ST-174	ST-225	ST-236	Uruguai
<i>wsp</i>	584	531	585	588	583
HVR1	2	2	2	88	2
HVR2	17	151	35	237	17
HVR3	3	141	3	8	3
HVR4	234	239	234	242	240

Análises bayesianas e por distância conduzidas com as sequências do gene *wsp* resultaram em árvores filogenéticas com topologias idênticas, sendo, portanto, apresentada somente a árvore resultante da análise bayesiana (Figura 3.3). A análise filogenética dos STs de *Wolbachia* associados a *D. citri* no Brasil utilizando o gene *wsp* como marcador molecular levou à formação dos mesmos grupos produzidos nas análises com os genes utilizados para o MLST. Assim, os STs-173 e 175 e os STs-174 e 236 formaram clados próprios, separados do ST-225, sendo o clado dos STs-174 e 236 o que se colocou mais externamente ao grande clado formado por todas as sequências de *wsp* obtidas de *D. citri* no Brasil (Figura 3.3). O posicionamento dos STs de *Wolbachia*, dado pela análise filogenética utilizando o gene *wsp* como marcador molecular, foi idêntica àquele apresentado pela análise bayesiana com as sequências concatenadas dos genes utilizados no MLST (Figura 3.2A). Dada a maior disponibilidade de sequências de *wsp* de *Wolbachia* em relação àquelas que definem os STs, pode-se observar também que as sequências de *wsp* referentes aos ST-173 (demais localidades amostradas neste trabalho) e 175 (*wsp*11-5 – Maringá-PR), juntamente com os *wsp* de *Wolbachia* associadas a populações de *D. citri* da Flórida (EUA) (*wsp*42) e Uruguai (*wsp*40), formaram um clado juntamente com sequências de *wsp* de três populações distantes de *D. citri* da China, apesar do clado não apresentar suporte significativo que permita a sua separação daquele formado pelo ST-225 e sequências associadas (Figura 3.3). Interessante ainda notar, além do posicionamento isolado do clado formado pelas sequências referentes aos STs-174 e 236, é a existência de sequência de *wsp* de *Wolbachia* associada a indivíduos de *D. citri* da Flórida (EUA) (Jeyaprakash & Hoy 2000) em clado separado daquele formado pelas sequências de *wsp* associadas aos demais STs relatados neste trabalho e aquelas representadas por indivíduos do Uruguai e China, incluindo amostras da própria Flórida (EUA) aqui obtidas (Figura 3.3)

Figura 3.2 – Relações filogenéticas das sequências-tipo (STs) de *Wolbachia* associadas a *Diaphorina citri* no Brasil em comparação aos STs associados às diferentes espécies de insetos hospedeiros desse simbiote, utilizando as sequências concatenadas dos marcadores moleculares utilizados na tipagem via sequenciamento de multilocus (MLST). A) Método bayesiano (Os valores indicam clados com probabilidade posterior > 80%); B) Árvore de Neighbor-joining com modelo de distância p (Unidades colocadas nas intersecções dos ramos representam os valores de “bootstrap”). Os táxons marcados em vermelho são os STs definidos neste trabalho

Figura 3.3 - Árvore filogenética baseada na análise bayesiana de linhagens de *Wolbachia* associadas a *Diaphorina citri* e diversos outros insetos hospedeiros, utilizando sequências do gene *wsp*. Os valores colocados nas intersecções dos ramos indicam clados com probabilidade posterior > 80%

A análise haplotípica resultou na identificação de 24 haplótipos, sendo 16 deles haplótipos únicos. O haplótipo 1, provavelmente o ancestral, dada à sua abundância em relação aos demais, está distribuído em todas as populações, com exceção da população de Botucatu (SP). O haplótipo 1 normalmente o mais abundante em todas as populações analisadas, sendo o único encontrado na população de Boa Vista (RR), caracterizando esta população como aquela de menor diversidade haplotípica. A população de Mogi Mirim, ao contrário, se mostrou como a mais diversa, contando com nove haplótipos distintos, vários deles únicos (Figura 3.4A).

Dado os possíveis efeitos de *Wolbachia* na reprodução do hospedeiro, a ocorrência de vários STs de *Wolbachia* e a ausência de indivíduos com infecções múltiplas, esperava-se maior diversidade intrapopulacional nas populações que apresentaram mais de uma linhagem do simbiote, como Itapetininga (SP), Maringá (PR) e Três Lagoas (MS). Porém, a diversidade haplotípica dessas populações foi semelhante àquela de populações em que apenas o ST-173 foi identificado, como, por exemplo, Itapetininga (SP) (diversidade haplotípica = 0,4643) e Palmeiras D'Oeste (SP) (diversidade haplotípica = 0,4643), ou Maringá (PR) (diversidade haplotípica = 0,9000) e Mogi Mirim (SP) (diversidade haplotípica = 0,9778) (Tabela 3.6).

As análises de diversidade genética das populações de *D. citri*, utilizando-se de 468 bases do gene da COI, e dos diversos STs identificados no Brasil, não permitiu identificar qualquer associação específica entre STs particulares de *Wolbachia* a haplótipos específicos de *D. citri*, dado, principalmente, pela baixa frequência de ocorrência de vários dos STs identificados (Figura 3.4AB). O ST-173 foi o mais amplamente associado aos diversos haplótipos de *D. citri* identificados, sendo que, com exceção do ST-225, todos os demais STs identificados (ST-174, ST-175 e ST-236) encontraram-se associados a um único haplótipo, sempre com registros únicos. Os STs-174 e ST-175 associados ao haplótipo 1 e o ST-236 ao haplótipo 9 (Figura 3.4B). O ST-225 apresenta dois registros, um associado ao haplótipo mais comum, o haplótipo 1, e outro ao haplótipo 10 (Figura 3.4B). Apesar do haplótipo 10, ao lado do haplótipo 5, ser comum em várias das populações analisadas, todos os demais indivíduos do haplótipo 10 estavam infectados pelo ST-173 de *Wolbachia*, incluindo aqueles da população em que o ST-225 foi descrito (Três Lagoas – MS) (Figuras 3.1 e 3.4).

Tabela 3.6 – Medidas de diversidade haplotípica ($\pm$ DV) e diversidade nucleotídica ($\pm$ DV) geral e de cada população de *Diaphorina citri* em que *Wolbachia* foi caracterizada

População	Diversidade haplotípica ($\pm$ DV)	Diversidade nucleotídica ($\pm$ DV)
Araraquara – SP	0,3889 $\pm$ 0,1644	0,0008 $\pm$ 0,0009
Barretos – SP	0,7857 $\pm$ 0,1508	0,0046 $\pm$ 0,0032
Boa Vista – RR	0,0000 $\pm$ 0,0000	0,0000 $\pm$ 0,0000
Botucatu – SP	0,6000 $\pm$ 0,1753	0,0012 $\pm$ 0,0014
Espírito Santo do Turvo – SP	0,5556 $\pm$ 0,1653	0,0038 $\pm$ 0,0027
Itapetininga – SP	0,4643 $\pm$ 0,2000	0,0021 $\pm$ 0,0018
Maringá – PR	0,9000 $\pm$ 0,1610	0,0030 $\pm$ 0,0025
Mogi Mirim – SP	0,9778 $\pm$ 0,0540	0,0065 $\pm$ 0,0042
Palestina – SP	0,8333 $\pm$ 0,0980	0,0052 $\pm$ 0,0035
Palmeiras D'Oeste – SP	0,4643 $\pm$ 0,2000	0,0011 $\pm$ 0,0011
Penápolis – SP	0,8667 $\pm$ 0,0850	0,0039 $\pm$ 0,0027
Ribeirão Preto – SP	0,5238 $\pm$ 0,2086	0,0012 $\pm$ 0,0013
Santa Cruz da Conceição – SP	0,7222 $\pm$ 0,0967	0,0022 $\pm$ 0,0018
Santa Fé do Sul – SP	0,4167 $\pm$ 0,1907	0,0021 $\pm$ 0,0018
Três Lagoas – MS	0,6667 $\pm$ 0,3143	0,0014 $\pm$ 0,0017
Geral	0,7110 $\pm$ 0,0416	0,0035 $\pm$ 0,0023

Figura 3.4 – Distribuição relativa (A) dos haplótipos de *Diaphorina citri* nas diversas populações analisadas e (B) da associação das sequências-tipo (STs) de *Wolbachia* aos diferentes haplótipos de *D. citri*. Dados de frequência entre as seguintes variáveis: A) Relação população-haplótipo (em A, colunas em branco representam haplótipos únicos, sendo a identificação dos mesmos grafada no interior de cada coluna; em B, a coluna “Outros” representa todos os haplótipos, com exceção do 1, 9 e 10)

3.2.4 Discussão

Wolbachia está fixada às populações de *D. citri* distribuídas por vários estados do Brasil, principalmente o de São Paulo. Apesar da sua constatação em 100% dos indivíduos analisados, vários foram os espécimes que necessitaram da realização de PCR aninhado para a detecção da presença do simbiote. A existência de PCR falso-negativos em análises da ocorrência de *Wolbachia* é comumente relatada em inúmeros casos, sendo várias as estratégias propostas para solucionar este problema, as quais incluem métodos diretos (utilização de PCR longo, marcadores diversos, PCR aninhado) (JEYAPRAKASH; HOY, 2000; SUN; CUI; LI, 2007; ARTHOFER et al., 2009a; ATYAME et al., 2011) e indiretos de detecção (amplificação de sequências específicas de bacteriófagos WO) (CHARLAT et al., 2009; CHAFEE et al., 2010). Alguns autores ainda sugerem a utilização de diversos métodos de extração e a utilização de polimerases de DNA de diferentes fontes comerciais (HUGHES et al., 2011). A baixa densidade de células do simbiote por hospedeiro pode ser um dos principais fatores a contribuir ocorrência desses falsos negativos em organismos infectados por este simbiote é comum (KYEI-POKU et al., 2005; ARTHOFER et al., 2009b). Apesar da existência de relatos que indicam que a variação na densidade de células do simbiote por hospedeiro seja resultante de fatores relacionados ao próprio hospedeiro e/ou simbiote, os mecanismos reguladores do processo de replicação de *Wolbachia* e de sua densidade no interior do hospedeiro ainda permanecem obscuros (McGRAW et al., 2002; VENETI et al., 2004).

Apesar dos vários relatos existentes de infecções múltiplas em indivíduos de populações de inúmeras espécies de insetos (REUTER; KELLER, 2003; KAWASAKI et al., 2010; WATANABE et al., 2011), as várias sequências-tipo de *Wolbachia* infectando populações de *D. citri* no Brasil não foram encontradas em indivíduos com infecções múltiplas. A caracterização de indivíduos contendo múltiplas linhagens de *Wolbachia* era descrita, exclusivamente, pela caracterização do gene *wsp* (REUTER; KELLER, 2003; KAWASAKI et al., 2010; WATANABE et al., 2011), mesmo dada à reconhecida capacidade de recombinação do gene *wsp* (BALDO et al., 2005). Apenas muito recentemente é que a caracterização de linhagens de *Wolbachia* via MLST em indivíduos com múltipla infecção se tornou possível (ARTHOFER et al., 2011).

Infecções múltiplas podem ser decorrentes de mutações no genoma de *Wolbachia* (MALLOCH; FENTON; BUTCHER, 2000), recombinação ente diferentes linhagens de *Wolbachia* coexistindo em um único indivíduo (REUTER; KELLER, 2003) ou, ainda, pela aquisição de novas linhagens via transmissão horizontal (JAMMONGLUK et al., 2002; SINTUPACHEE et al., 2006). Apesar das análises filogenéticas dos STs de *Wolbachia* indicarem a existência de linhagens muito semelhantes infectando as populações de *D. citri* no Brasil, sendo algumas delas indistintas quando apenas o *wsp* foi analisado, sugerindo que as mesmas possam ser decorrentes de mutações do genoma do simbionte (STs-173 e 175; STs-174 e 236), nenhum indivíduo das 15 populações estudadas apresentou infecção por mais de uma das linhagens de *Wolbachia* identificadas. As diferenças entre os clados de *Wolbachia* em que os STs de *Diaphorina citri* se encontram, seja pelas análises de MLST ou de *wsp*, sustentam a existência de três grupos bem distintos de *Wolbachia*, apesar da interação e do padrão de divergência entre as linhagens não estar completamente definido, dado o lento padrão de divergência nessa bactéria, que ocorre à taxa de divergência de 0,8% por milhão de anos (OCHNAM; WILSON, 1987). A predominância quase que absoluta do ST-173 e a ocorrência minoritária e, na maioria dos casos, quase que exclusiva a indivíduos únicos para os demais STs, sugere que o ST-173 seja o ST que acompanhou a população inicial desse psílideo quando de sua invasão no Brasil. Esta hipótese ganha suporte ao se verificar que este ST compartilha sequência de *wsp* idêntica àquela de *Wolbachia* infectando psíldeos de diferentes regiões do mundo (Figura 3.3).

Caso os demais STs tivessem sido adquiridos via transmissão horizontal, seria de se esperar a ocorrência de indivíduos contendo essas linhagens em associação ao ST-173, visto que os demais STs ocorrem em frequência bastante reduzida. Mesmo que os demais STs fossem capazes de inibir a multiplicação do ST-173, tornando a infecção pelo ST-173 indetectável, dada a existência de infecções por linhagens crípticas (ARTHOFER et al., 2009b), seria de se esperar que os haplótipos associados a essas infecções carregassem esses novos STs e se disseminassem pela população, assim como relatado em outras espécies (TURELLI; HOFFMANN; McKECHNIE, 1992; NUNES; NOLTE; SCHLOTTERER, 2008; CHARLAT et al., 2009; RODRIGUERO;

LANTERI; CONFALONIERI, 2010). A disseminação desses haplótipos contendo infecções múltiplas só não ocorreria caso as novas linhagens adquiridas apresentassem elevado custo adaptativo ao hospedeiro, resultando em fêmeas com capacidade de produzir indivíduos infectados por múltiplas linhagens menor do que a de fêmeas que produzissem progênie sem infecção ou infectadas por linhagens únicas (ENGELSTADTER; HAMMERSTEIN; HURST, 2007). Porém, muitos dos STs raros (STs-174, 175, 225 e 236) identificados ocorrem em um único haplótipo, com exceção do ST-225, presente em dois haplótipos de uma única população (Figuras 3.1 e 3.4B). Assim, acreditamos que os STs de *Wolbachia* que infectam as populações de *D. citri* no Brasil e que ocupam clados distintos nas análises filogenéticas, utilizando-se de sequências de genes obtidas via MLST e/ou *wsp*, são decorrentes de novas invasões de *D. citri* no Brasil decorrentes de um mesmo centro de origem. Esta hipótese é baseada nos resultados das análises de filogeografia das populações de *D. citri* presentes no Brasil em relação àquelas distribuídas pelo mundo (ver capítulo 1), assim como pela detecção do HLB e da bactéria *Ca. Liberibacter asiaticus* no Brasil (TEIXEIRA et al., 2005b). Dessa forma, acreditamos que indivíduos dessa nova população invasora, infectados por STs distintos daquele predominante na população originalmente introduzida no Brasil, estejam em processo de eliminação dada a incompatibilidade entre os mesmos. Porém, estudos que permitam avaliar a compatibilidade entre as diversas linhagens de *Wolbachia* associadas a *D. citri* no Brasil ainda necessitam ser realizados e requerem o estabelecimento de isolinhagens de psílídeos infectados pelas mesmas. Esses estudos têm sido limitados pela baixíssima frequência dos STs raros de *Wolbachia* e pelas medidas intensas de controle químico desse inseto, as quais têm mantido *D. citri* em níveis populacionais extremamente reduzidos, dificultando sua coleta nas áreas onde os STs raros foram identificados e o estabelecimento de suas isolinhagens.

3.3 Conclusões

- *Wolbachia* ocorre em todas as populações de *D. citri* estudadas;

- Existe mais de uma linhagem de *Wolbachia* associada às populações de *D. citri* no Brasil;
- O ST-173 é o predominante e ocorre em todas as populações analisadas;
- Os STs associados a *D. citri* no Brasil se agrupam em clado definido, mas separados em três grupos distintos;
- A presença de *Wolbachia* não influencia o padrão do DNA mitocondrial das populações de *D. citri* no Brasil

Referências

AHRENS, M.E.; SHOEMAKER, D. Evolutionary history of *Wolbachia* infections in the fire ant *Solenopsis invicta*. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 5, May 2005. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2148/5/35>>. Acesso em: 06 jul. 2010.

ANDERSON, C.L.; KARR, T.L. *Wolbachia*: evolutionary novelty in a rickettsial bacteria. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 1, Nov 2001. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2148/1/10>>. Acesso em: 07 ago. 2009.

ARMBRUSTER, P.; DAMSKY, W.E.; GIORDANO, R.; BIRUNGI, J.; MUNSTERMANN, L.E.; CONN, J.E. Infection of new- and old-world *Aedes albopictus* (Diptera : Dulicidae) by the intracellular parasite *Wolbachia*: Implications for host mitochondrial DNA evolution. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 40, n. 3, p. 356-360, May 2003.

ARTHOFFER, W.; RIEGLER, M.; AVTZIS D.; STAUFFER, C. Evidence for low-titre infections in insect symbiosis: *Wolbachia* in the bark beetle *Pityogenes chalcographus* (Coleoptera, Scolytinae). **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 8, p. 1923-1933, Aug. 2009.

ARTHOFFER, W.; RIEGLER, M.; SCHNEIDER, D.; KRAMMER, M.; MILLER, W.J.; STAUFFER, C. Hidden *Wolbachia* diversity in field populations of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 18, n. 18, p. 3816-3830, Sept. 2009.

ARTHOFFER, W.; RIEGLER, M.; SCHULER, H.; SCHNEIDER, D.; MODER, K.; MILLER, W.J.; STAUFFER, C. Allele intersection analysis: a novel tool for multi locus sequence assignment in multiply infected hosts. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 7, July 2011.

Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0022198>>. Acesso em: 12 nov. 2011.

ATYAME, C.M.; DURON, O.; TORTOSA, P.; PASTEUR, N.; FORT, P.; WEILL, M. Multiple *Wolbachia* determinants control the evolution of cytoplasmic incompatibilities in *Culex pipiens* mosquito populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 20, n. 2, p. 286-298, Jan. 2011.

BALDO, L.; AYOUB, N. A.; HAYASHI, C.Y.; RUSSELL, J.A.; STAHLHUT, J.K.; WERREN, J.H. Insight into the routes of *Wolbachia* invasion: high levels of horizontal transfer in the spider genus *Agelenopsis* revealed by *Wolbachia* strain and mitochondrial DNA diversity. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 557-569, Jan. 2008.

BALDO, L.; HOTOPP, J.C.D.; JOLLEY, K.A.; BORDENSTEIN, S.R.; BIBER, S.A.; CHOUDHURY, R.R.; HAYASHI, C.; MAIDEN, M.C.J.; TETTELIN, H.; WERREN, J.H. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 11, p. 7098-7110, Nov. 2006.

BALDO, L.; LO, N.; WERREN, J.H. Mosaic nature of the *Wolbachia* surface protein. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, n. 15, p. 5406-5418, Aug. 2005.

BALLARD, J.W.O. Comparative genomics of mitochondrial DNA in *Drosophila simulans*. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 51, n. 1, p. 64-75, July 2000.

BALLARD, J.W.O.; KREITMAN, M. Unraveling selection in the mitochondrial genome of *Drosophila*. **Genetics**, Austin, v. 138, n. 3, p. 757-772, Nov. 1994.

BALLARD, J.W.O.; WHITLOCK, M.C. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 729-744, Apr. 2004.

BASS, C.; FIELD, L.M. Gene amplification and insecticide resistance. **Pest Management Science**, Sussex, v. 67, n. 8, p. 886-890, Aug. 2011.

BAUDRY, E.; BARTOS, J.; EMERSON, K.; WHITWORTH, T.; WERREN, J.H. *Wolbachia* and genetic variability in the birdnest blowfly *Protocalliphora sialia*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 7, p. 1843-1854, July 2003.

BAUMANN, P. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 59, p. 155-189, Oct 2005.

BAZZOCCHI, C.; JAMNONGLUK, W.; O'NEILL, S.L.; ANDERSON, T.J.C.; GENCHI, C.; BANDI, C. *wsp* gene sequences from the *Wolbachia* of filarial nematodes. **Current Microbiology**, New York, v. 41, n. 2, p. 96-100, Aug. 2000.

BEARD, C.B.; CORDON-ROSALES, C.; DURVASULA, R.V. Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of chagas disease transmission. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 47, p. 123-141, 2002.

BENSASSON, D.; ZHANG, D.X.; HARTL, D.L.; HEWITT, G.M. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 16, n. 6, p. 314-321, June 2001.

BIAN, G.; XU, Y.; LU, P.; XIE, Y.; XI, Z. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 6, n. 4, Apr. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000833>>. Acesso em: 28 abr. 2010.

BIRUNGI, J.; MUNSTERMANN, L.E. Genetic structure of *Aedes albopictus* (Diptera : Culicidae) populations based on mitochondrial ND5 sequences: Evidence for an independent invasion into Brazil and United States. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 95, n. 1, p. 125-132, Jan. 2002.

BORDENSTEIN, S.R.; MARSHALL, M.L.; FRY, A.J.; KIM, U.; WERNEGREN, J.J. The tripartite associations between bacteriophage, *Wolbachia*, and arthropods. **Plos Pathogens**, San Francisco, v. 2, n. 5, p. 384-393, May 2006.

BOVE, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 88, n. 1, p. 7-37, Mar. 2006.

BRAIG, H.R.; ZHOU, W.G.; DOBSON, S.L.; O'NEILL, S.L. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, n. 9, p. 2373-2378, May 1998.

BRIGHT, M.; BULGHERESI, S. A complex journey: transmission of microbial symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, n. 3, p. 218-230, Mar. 2010.

BROWNLIE, J.C.; ADAMSKI, M.; SLATKO, B.; MCGRAW, E.A. Diversifying selection and host adaptation in two endosymbiont genomes. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, p. 12, Apr. 2007.

BUCHNER, P. **Endosymbiosis of animals with plant microorganisms**. New York: Interscience, 1965. 909 p.

CHAFEE, M.E.; FUNK, D.J.; HARRISON, R.G.; BORDENSTEIN, S.R. Lateral phage transfer in obligate intracellular bacteria (*Wolbachia*): verification from natural populations. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 27, n. 3, p. 501-505, Mar. 2010.

CHANG, K.P.; MUSGRAVE, A.J. Histochemistry and ultrastructure of the mycetome and its symbiotes in the pear psylla, *Psylla pyricola* Foerster (Homoptera). **Tissue and Cell**, Essex, v. 1, n. 4, p. 597-606, Oct. 1969.

CHARLAT, S.; DUPLOUY, A.; HORNETT, E.A.; DYSON, E.A.; DAVIES, N.; RODERICK, G.K.; WEDELL, N.; HURST, G.D.D. The joint evolutionary histories of *Wolbachia* and mitochondria in *Hypolimnas bolina*. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 9, Mar. 2009. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2148/9/64>>. Acesso em: 12 out. 2011.

CONN, V.M.; WALKER, A.R.; FRANCO, C.M.M. Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 21, n. 2, p. 208-218, Feb. 2008.

COOK, J.M.; BUTCHER, R.D.J. The transmission and effects of *Wolbachia* bacteria in parasitoids. **Researches on Population Ecology**, Tokyo, v. 41, n. 1, p. 15-28, Apr. 1999.

CURRIE, C.R. A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 55, p. 357-380, Oct. 2001.

DEAN, M.D.A *Wolbachia*-associated fitness benefit depends on genetic background in *Drosophila simulans*. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, Edinburgh, v. 273, n. 1592, p. 1415-1420, June 2006.

DEAN, M.D.; BALLARD, K.J.; GLASS, A.; BALLARD, J.W.O. Influence of two *Wolbachia* strains on population structure of East African *Drosophila simulans*. **Genetics**, Austin, v. 165, n. 4, p. 1959-1969, Dec. 2003.

DEDEINE, F.; VAVRE, F.; SHOEMAKER, D.D.; BOULETREAU, M. INTRA-individual coexistence of a *Wolbachia* strain required for host oogenesis with two strains inducing cytoplasmic incompatibility in the wasp *Asobara tabida*. **Evolution**, Lancaster, v. 58, n. 10, p. 2167-2174, Oct. 2004

DEDEINE, F.; VAVRE, F.; FLEURY, F.; LOPPIN, B.; HOCHBERG, M.E.; BOULETREAU, M. Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 11, p. 6247-6252, May 2001.

DOBSON, S.L. Evolution of *Wolbachia* cytoplasmic incompatibility types. **Evolution**, Lancaster, v. 58, n. 10, p. 2156-2166, Oct. 2004.

DOUGLAS, A.E. The microbial dimension in insect nutritional ecology. **Functional Ecology**, Oxford, v. 23, p. 38-47, May 2009.

_____. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: Aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 43, p. 17-37, Jan. 1998.

DRUMMOND, A.J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **Bmc Evolutionary Biology**, London, v. 7, Nov. 2007. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2148/7/214>>. Acesso em: 05 out. 2010.

DURON, O.; LABBE, P.; BERTICAT, C.; ROUSSET, F.; GUILLOT, S.; RAYMOND, M.; WEILL, M. High *Wolbachia* density correlates with cost of infection for insecticide resistant *Culex pipiens* mosquitoes. **Evolution**, Lancaster, v. 60, n. 2, p. 303-314, Feb. 2006.

DURVASULA, R.V.; GUMBS, A.; PANACKAL, A.; KRUGLOV, O.; AKSOY, S.; MERRIFIELD, R.B.; RICHARDS, F.F.; BEARD, C.B. Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 7, p. 3274-3278, Apr. 1997.

DYER, K.A.; JAENIKE, J. Evolutionarily stable infection by a male-killing endosymbiont in *Drosophila innubila*: Molecular evidence from the host and parasite genomes. **Genetics**, Austin, v. 168, n. 3, p. 1443-1455, Nov. 2004.

ENGELSTADTER, J.; HAMMERSTEIN, P.; HURST, G.D.D. The evolution of endosymbiont density in doubly infected host species. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 20, n. 2, p. 685-695, Mar. 2007.

ENIGL, M.; SCHAUSBERGER, P. Incidence of the endosymbionts *Wolbachia*, *Cardinium* and *Spiroplasma* in phytoseiid mites and associated prey. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 42, n. 2, p. 75-85, June 2007.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 564-567, May 2010.

FUKATSU, T.; NIKOH, N. Two intracellular symbiotic bacteria from the mulberry psyllid *Anomoneura mori* (Insecta, Homoptera). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 10, p. 3599-3606, Oct. 1998.

GODFRAY, H.C.J. An insect-endosymbiont conundrum. **Heredity**, London, v. 104, n. 3, p. 237-238, Mar. 2010.

HAINE, E.R. Symbiont-mediated protection. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, Edinburgh, v. 275, n. 1633, p. 353-361, Feb. 2008.

HARRIS, H.L.; BRENNAN, L.J.; KEDDIE, B.A.; BRAIG, H.R. Bacterial symbionts in insects: balancing life and death. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 51, n. 1, p. 37-53, July 2010.

HEBERT, P.D.N.; GREGORY, T.R. The promise of DNA barcoding for taxonomy. **Systematic Biology**, Washington, v. 54, n. 5, p. 852-859, Oct. 2005.

HOFSTETTER, R.W.; KLEPZIG, K.D.; MOSER, J.C.; AYRES, M.P. Seasonal dynamics of mites and fungi and their interaction with Southern pine beetle. **Environmental Entomology**, College Park, v. 35, n. 1, p. 22-30, Sept. 2006.

HORNETT, E.A.; CHARLAT, S.; DUPLOUY, A.M.R.; DAVIES, N.; RODERICK, G.K.; WEDELL, N.; HURST, G.D.D. Evolution of male-killer suppression in a natural population. **Plos Biology**, San Francisco, v. 4, n. 9, p. 1643-1648, Sept. 2006.

HOSOKAWA, T.; KOGA, R.; KIKUCHI, Y.; MENG, X. Y.; FUKATSU, T. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 2, p. 769-774, Jan. 2010.

HUGHES, G.L.; ALLSOPP, P.G.; BRUMBLEY, S.M.; WOOLFIT, M.; MCGRAW, E.A.; O'NEILL, S.L. Variable infection frequency and high diversity of multiple strains of *Wolbachia pipientis* in *Perkinsiella* planthoppers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 6, p. 2165-2168, Mar. 2011.

HUNTER, M.S.; PERLMAN, S.J.; KELLY, S.E. A bacterial symbiont in the *Bacteroidetes* induces cytoplasmic incompatibility in the parasitoid wasp *Encarsia pergandiella*. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, Edinburgh, v. 270, n. 1529, p. 2185-2190, Oct. 2003.

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**, Edinburgh, v. 272, n. 1572, p. 1525-1534, Aug. 2005.

HURST, G.D.D.; JIGGINS, F.M.; VON DER SCHULENBURG, J.H.G.; BERTRAND, D.; WEST, S.A.; GORIACHEVA, I.I.; ZAKHAROV, I.A.; WERREN, J.H.; STOUTHAMER, R.; MAJERUS, M.E.N. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, Edinburgh, v. 266, n. 1420, p. 735-740, Apr. 1999.

JAENIKE, J. Spontaneous emergence of a new *Wolbachia* phenotype. **Evolution**, Lancaster, v. 61, n. 9, p. 2244-2252, Sept. 2007.

_____. Coupled population dynamics of endosymbionts within and between hosts. **Oikos**, Buenos Aires, v. 118, n. 3, p. 353-362, Mar. 2009.

JAMNONGLUK, W.; KITTAYAPONG, P.; BAIMAI, V.; O'NEILL, S.L. *Wolbachia* infections of tephritid fruit flies: Molecular evidence for five distinct strains in a single host species. **Current Microbiology**, New York, v. 45, n. 4, p. 255-260, Oct. 2002.

JEYAPRAKASH, A.; HOY, M.A. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 393-405, Aug. 2000.

JIGGINS, F.M. Male-killing *Wolbachia* and mitochondrial DNA: Selective sweeps, hybrid introgression and parasite population dynamics. **Genetics**, Austin, v. 164, n. 1, p. 5-12, May 2003.

JIGGINS, F.M.; HURST, G.D.D.; YANG, Z.H. Host-symbiont conflicts: positive selection on an outer membrane protein of parasitic but not mutualistic Rickettsiaceae. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 19, n. 8, p. 1341-1349, Aug. 2002.

KAMBHAMPATI, S.; RAI, K.S.; VERLEYE, D.M. Frequencies of mitochondrial – DNA haplotypes in laboratory cage populations of the mosquito *Aedes albopictus*. **Genetics**, Austin, v. 132, n. 1, p. 205-209, Sept. 1992.

KAMBRIS, Z.; BLAGBOROUGH, A.M.; PINTO, S.B.; BLAGROVE, M.S.C.; GODFRAY, H.C.J.; SINDEN, R.E.; SINKINS, S.P. *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits *Plasmodium* Development in *Anopheles gambiae*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 10, Oct. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001143>>. Acesso em: 10 ago. 2011.

KAWASAKI, Y.; ITO, M.; MIURA, K.; KAJIMURA, H. Superinfection of five *Wolbachia* in the alnus ambrosia beetle, *Xylosandrus germanus* (Blandford) (Coleoptera: Curculionidae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 100, n. 2, p. 231-239, Apr. 2010

KLASSON, L.; KAMBRIS, Z.; COOK, P.E.; WALKER, T.; SINKINS, S.P. Horizontal gene transfer between *Wolbachia* and the mosquito *Aedes aegypti*. **BMC Genomics**, London, v. 10, n.33, Jan. 2009.

KLEPZIG, K.D.; ADAMS, A.S.; HANDELSMAN, J.; RAFFA, K.F. Symbioses: a key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans. **Environmental Entomology**, College Park, v. 38, n. 1, p. 67-77, Feb. 2009.

KOGA, R.; TSUCHIDA, T.; FUKATSU, T. Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, London, v. 270, n. 1533, p. 2543-2550, Dec. 2003.

KONTSEDALOV, S.; ZCHORI-FEIN, E.; CHIEL, E.; GOTTLIEB, Y.; INBAR, M.; GHANIM, M. The presence of *Rickettsia* is associated with increased susceptibility of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides. **Pest Management Science**, Sussex, v. 64, n. 8, p. 789-792, Aug. 2008.

KREMER, N.; VORONIN, D.; CHARIF, D.; MAVINGUI, P.; MOLLEREAU, B.; VAVRE, F. *Wolbachia* Interferes with Ferritin Expression and Iron Metabolism in Insects. **Plos Pathogens**, San Francisco, v. 5, n. 10, Oct. 2009. Disponível em: <<http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.100063>>. Acesso em: 20 fev. 2010.

KROEMER, J.A.; WEBB, B.A. Polydnavirus genes and genomes: emerging gene families and new insights into polydnavirus replication. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 49, p. 431-451, Jan. 2004.

KYEI-POKU, G.K.; COLWELL, D.D.; COGHLIN, P.; BENKEL, B.; FLOATE, K.D. On the ubiquity and phylogeny of *Wolbachia* in lice. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 285-294, Jan. 2005.

LACHAISE, D.; HARRY, M.; SOLIGNAC, M.; LEMEUNIER, F.; BENASSI, V.; CARIOU, M. L. Evolutionary novelties in islands: *Drosophila santomea*, a new melanogaster sister species from Sao Tome. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, London, v. 267, n. 1452, p. 1487-1495, Aug. 2000.

LO, N.; CASIRAGHI, M.; SALATI, E.; BAZZOCCHI, C.; BANDI, C. How many *Wolbachia* supergroups exist? **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 19, n. 3, p. 341-346, Mar. 2002.

LOGIN, F.H.; BALMAND, S.; VALLIER, A.; VINCENT-MONEGAT, C.; VIGNERON, A.; WEISS-GAYET, M.; ROCHAT, D.; HEDDI, A. Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control. **Science**, Washington, v. 334, n. 6054, p. 362-365, Oct. 2011.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A.J.; BARBOSA, J.C. Ineffectiveness of pruning to control citrus huanglongbing caused by *Candidatus Liberibacter americanus*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 119, n. 4, p. 463-468, Dec. 2007.

MALLOCH, G.; FENTON, B.; BUTCHER, R.D.J. Molecular evidence for multiple infections of a new subgroup of *Wolbachia* in the European raspberry beetle *Byturus tomentosus*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 77-90, Jan. 2000.

MARCADE, I.; SOUTY-GROSSET, C.; BOUCHON, D.; RIGAUD, T.; RAIMOND, R. Mitochondrial DNA variability and *Wolbachia* infection in two sibling woodlice species. **Heredity**, London, v. 83, p. 71-78, July 1999.

MCCUTCHEON, J.P.; MORAN, N.A. Parallel genomic evolution and metabolic interdependence in an ancient symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 49, p. 19392–19397, Dec. 2007.

MCGRAW, E.A.; MERRITT, D.J.; DROLLER, J.N.; O'NEILL, S.L. *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 5, p. 2918-2923, Mar. 2002.

MCMENIMAN, C.J.; LANE, R.V.; CASS, B.N.; FONG, A.W.C.; SIDHU, M.; WANG, Y.F.; O'NEILL, S.L. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* Infection into the mosquito *Aedes aegypti*. **Science**, Washington, v. 323, n. 5910, p. 141-144, Jan. 2009.

MONTLLOR, C.B.; MAXMEN, A.; PURCELL, A.H. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. **Ecological Entomology**, London, v. 27, n. 2, p. 189-195, Apr. 2002.

MORAN, N.A. Symbiosis. **Current Biology**, London, v. 16, n. 20, Oct. 2006. Disponível em: <<http://000241532000008>>. Acesso em: 14 jan. 2007.

MORAN, N.A.; MCCUTCHEON, J.P.; NAKABACHI, A. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 42, p. 165-190, Dec. 2008

MOREIRA, L.A.; ITURBE-ORMAETXE, I.; JEFFERY, J.A.; LU, G.J.; PYKE, A.T.; HEDGES, L.M.; ROCHA, B.C.; HALL-MENDELIN, S.; DAY, A.; RIEGLER, M.; HUGO, L.E.; JOHNSON, K.N.; KAY, B.H.; MCGRAW, E.A.; VAN DEN HURK, A.F.; RYAN, P.A.; O'NEILL, S.L. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, *Chikungunya*, and *Plasmodium*. **Cell**, Cambridge, v. 139, n. 7, p. 1268-1278, Dec. 2009.

MOTA, M.; TAKEMOTO, S.; TAKEUCHI, Y.; FUTAI, K. Comparative studies between Portuguese and Japanese isolates of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **The Journal of Nematology**, College Park, v. 38, n. 4, p. 429–433, Dec. 2006.

MOUTON, L.; HENRI, H.; FLEURY, F. Interactions between coexisting intracellular genomes: mitochondrial density and *Wolbachia* Infection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 7, p. 1916-1921, Apr. 2009.

NAKAJIMA, H.; HONGO, Y.; USAMI, R.; KUDO, T.; OHKUMA, M. Spatial distribution of bacterial phylotypes in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* and the bacterial community colonizing the gut epithelium. **Fems Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 54, n. 2, p. 247-255, Oct. 2005.

NUNES, M.D.S.; NOLTE, V.; SCHLOTTERER, C. Nonrandom *Wolbachia* infection status of *Drosophila melanogaster* Strains with different mtDNA haplotypes. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 25, n. 11, p. 2493-2498, Nov. 2008.

OCHMAN, H.; WILSON, A.C. Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 26, n. 1/2, p. 74-86, 1987.

OLIVER, K.M.; RUSSELL, J.A.; MORAN, N.A.; HUNTER, M.S. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 4, p. 1803-1807, Feb. 2003.

PENG, Y.; NIELSEN, J.E.; CUNNINGHAM, J.P.; MCGRAW, E.A. *Wolbachia* infection alters olfactory-cued locomotion in *Drosophila* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 13, p. 3943-3948, July 2008.

PERLMAN, S.J.; KELLY, S.E.; ZCHORI-FEIN, E.; HUNTER, M.S. Cytoplasmic incompatibility and multiple symbiont infection in the ash whitefly parasitoid, *Encarsia inaron*. **Biological Control**, Orlando, v. 39, n. 3, p. 474-480, Dec. 2006.

PERROTMINNOT, M.J.; GUO, L.R.; WERREN, J.H. Single and double infections with *Wolbachia* in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*: effects on compatibility. **Genetics**, Austin, v. 143, n. 2, p. 961-972, June 1996.

POULSON, D.F.; SAKAGUCHI, B. Nature of sex-ratio agent in *Drosophila*. **Science**, Washington, v. 133, n. 346, p. 1489-1490, May 1961.

PRESGRAVES, D.C. A genetic test of the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila*. **Genetics**, Austin, v. 154, n. 2, p. 771-776, Feb. 2000.

RELMAN, D.A. 'Til death do us part': coming to terms with symbiotic relationships. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 6, n. 10, p. 721-724, Oct. 2008.

REUTER, M.; KELLER, L. High levels of multiple *Wolbachia* infection and recombination in the ant *Formica exsecta*. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 20, n. 5, p. 748-753, May 2003.

RICHARD, F.J.; POULSEN, M.; HEFETZ, A.; ERRARD, C.; NASH, D.; BOOMSMA, J. The origin of the chemical profiles of fungal symbionts and their significance for nestmate recognition in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 61, n. 11, p. 1637-1649, Sept. 2007.

RODRIGUERO, M.S.; LANTERI, A.A.; CONFALONIERI, V.A. Mito-nuclear genetic comparison in a *Wolbachia* infected weevil: insights on reproductive mode, infection age and evolutionary forces shaping genetic variation. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 10, Nov. 2010. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2148/10/340>>. Acesso em: 23 jun. 2011.

ROS, V.I.D.; FLEMING, V.M.; FEIL, E.J.; BREEUWER, J.A.J. How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 4, p. 1036-1043, Feb. 2009.

ROUSSET, F.; VAUTRIN, D.; SOLIGNAC, M. Molecular identification of *Wolbachia*, the agent of cytoplasmic incompatibility in relation with host mitochondrial types. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, London, v. 247, n. 1320, p. 163-168, Mar. 1992.

RUAN, Y.-M.; XU, J.; LIU, S.S. Effects of antibiotics on fitness of the B biotype and a non-B biotype of the whitefly *Bemisia tabaci*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 121, n. 2, p. 159-166, Oct. 2006.

RUANG-AREERATE, T.; KITTAYAPONG, P. *Wolbachia* transinfection in *Aedes aegypti*: a potential gene driver of dengue vectors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 33, p. 2534-2539, Aug. 2006.

SASAKI, T.; KAWAMURA, M.; ISHIKAWA, H. Nitrogen recycling in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: Involvement of yeast-like endosymbionts in uric acid metabolism. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 125-129, Feb. 1996.

SCHULENBURG, J.; HURST, G.D.D.; TETZLAFF, D.; BOOTH, G.E.; ZAKHAROV, I.A.; MAJERUS, M.E.N. History of infection with different male-killing bacteria in the two-spot ladybird beetle *Adalia bipunctata* revealed through mitochondrial DNA sequence analysis. **Genetics**, Austin, v. 160, n. 3, p. 1075-1086, Mar. 2002.

SHEN, S.K.; DOWD, P.F. Insect symbionts: a promising source of detoxifying enzymes. In: GLASS, J.E.; SWIFT, G. (Ed.). **Agricultural and synthetic polymers: biodegradability and utilization**. London: American Chemical Society, 1990. chap. 3, p. 33-37. (ACS Symposium Series, 433).

SHOEMAKER, D.D.; KELLER, G.; ROSS, K.G. Effects of *Wolbachia* on mtDNA variation in two fire ant species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 7, p. 1757-1771, July 2003.

SHOEMAKER, D.D.; ROSS, K.G.; KELLER, L.; VARGO, E.L.; WERREN, J.H. *Wolbachia* infections in native and introduced populations of fire ants (*Solenopsis* spp.). **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 9, n. 6, p. 661-673, Dec. 2000.

SINTUPACHEE, S.; MILNE, J.R.; POONCHAISRI, S.; BAIMAI, V.; KITTAYAPONG, P. Closely related *Wolbachia* strains within the pumpkin arthropod community and the potential for horizontal transmission via the plant. **Microbial Ecology**, Oxford, v. 51, n. 3, p. 294-301, Apr. 2006.

STAHLHUT, J.K.; DESJARDINS, C.A.; CLARK, M.E.; BALDO, L.; RUSSELL, J.A.; WERREN, J.H.; JAENIKE, J. The mushroom habitat as an ecological arena for global exchange of *Wolbachia*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, n. 9, p. 1940-1952, May 2010.

STOUTHAMER, R. The use of sexual versus asexual wasps in biological control. **Entomophaga**, Paris, v. 38, n. 1, p. 3-6, Mar. 1993.

STOUTHAMER, R.; LUCK, R.F. Influence of microbe-associated parthenogenesis on the fecundity of *Trichogramma deion* and *T. pretiosum* **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 67, n. 2, p. 183-192, May 1993.

STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J.A.J.; HURST, G.D.D. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 53, p. 71-102, Oct. 1999.

SUBANDIYAH, S.; NIKOH, N.; TSUYUMU, S.; SOMOWIYARJO, S.; FUKATSU, T. Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea). **Zoological Science**, Tokyo, v. 17, n. 7, p. 983-989, Sept. 2000.

SUN, X.; CUI, L.W.; LI, Z.H. Diversity and phylogeny of *Wolbachia* infecting *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) populations from China. **Environmental Entomology**, College Park, v. 36, n. 5, p. 1283-1289, Oct. 2007.

SUNNUCKS, P.; HALES, D.F. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 13, n. 3, p. 510-524, Mar. 1996.

TAGAMI, Y.; MIURA, K.; STOUTHAMER, R. How does infection with parthenogenesis-inducing *Wolbachia* reduce the fitness of *Trichogramma*? **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 78, n. 4, p. 267-271, Nov. 2001.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, Oct. 2011.

TEIXEIRA, D.D.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET, J.L.; DA COSTA, P.I.; AYRES, A.J.; BOVE, J. '*Candidatus Liberibacter americanus*', associated with citrus huanglongbing (greening disease) in Sao Paulo State, Brazil. **International Journal of**

Systematic and Evolutionary Microbiology, Reading, v. 55, p. 1857-1862, Sept. 2005.

TEXEIRA, D.C.; AYRES, J.; DE BARROS, A.P.; KITAJIMA, E.W.; TANAKA, F.A.O.; DANET, L.; JAGOUÉIX-EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVE, J.M. First report of a huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil and association of a new liberibacter species, "*Candidatus Liberibacter americanus*", with the disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 1, p. 107-107, Jan. 2005.

THAO, M.L.L.; BAUMANN, P. Evidence for multiple acquisition of *Arsenophonus* by whitefly species (Sternorrhyncha: Aleyrodidae). **Current Microbiology**, New York, v. 48, n. 2, p. 140-144, Feb. 2004.

TSUCHIDA, T.; KOGA, R.; FUKATSU, T. Host plant specialization governed by facultative symbiont. **Science**, Washington, v. 303, n. 5666, p. 1989-1989, Mar. 2004.

TURELLI, M. Cytoplasmic incompatibility in populations with overlapping generations. **Evolution**, Lancaster, v. 64, n. 1, p. 232-241, Jan. 2010

TURELLI, M.; HOFFMANN, A.A. Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila*. **Nature**, London, v. 353, n. 6343, p. 440-442, Oct. 1991.

TURELLI, M.; HOFFMANN, A.A.; MCKECHNIE, S.W. Dynamics of cytoplasmic incompatibility and mtDNA variation in natural *Drosophila simulans* populations **Genetics**, Austin, v. 132, n. 3, p. 713-723, Nov. 1992.

VENETI, Z.; CLARK, M.E.; KARR, T.L.; SAVAKIS, C.; BOURTZIS, K. Heads or tails: Host-parasite interactions in the *Drosophila-Wolbachia* system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 9, p. 5366-5372, Sept. 2004.

WATANABE, M.; MIURA, K.; HUNTER, M.S.; WAJNBERG, E. Superinfection of cytoplasmic incompatibility-inducing *Wolbachia* is not additive in *Orius strigicollis* (Hemiptera: Anthocoridae). **Heredity**, London, v. 106, n. 4, p. 642-648, Aug. 2011.

WEEKS, A.R.; REYNOLDS, K.T.; HOFFMANN, A.A.; MANN, H. *Wolbachia* dynamics and host effects: what has (and has not) been demonstrated? **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 17, n. 6, p. 257-262, June 2002.

WEEKS, A.R.; TURELLI, M.; HARCUMBE, W.R.; REYNOLDS, K.T.; HOFFMANN, A.A. From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. **Plos Biology**, San Francisco, v. 5, n. 5, p. 997-1005, May 2007.

WEISS, B.; AKSOY, S. Microbiome influences on insect host vector competence. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 27, n. 11, p. 514-522, Nov. 2011.

WELCHMAN, D.P.; AKSOY, S.; JIGGINS, F.; LEMAITRE, B. Insect immunity: from pattern recognition to symbiont-mediated host defense. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 6, n. 2, p. 107-114, Aug. 2009.

WERREN, J.H. Biology of *Wolbachia*. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 42, p. 587-609, Jan. 1997.

WERREN, J.H.; BALDO, L.; CLARK, M.E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 6, n. 10, p. 741-751, Oct. 2008.

WILKINSON, T.L. The elimination of intracellular microorganisms from insects: an analysis of antibiotic-treatment in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology**, New York, v. 119, n. 4, p. 871-881, Apr. 1998

YEN, J.H.; BARR, A.R. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. **Nature**, London, v. 232, n. 5313, p. 657-658, Aug. 1971.

ZABALOU, S.; CHARLAT, S.; NIRGIANAKI, A.; LACHAISE, D.; MERCOT, H.; BOURTZIS, K. Natural *Wolbachia* infections in the *Drosophila yakuba* species complex do not induce cytoplasmic incompatibility but fully rescue the wRi modification. **Genetics**, Austin, v. 167, n. 2, p. 827-834, June 2004.

ZABALOU, S.; RIEGLER, M.; THEODORAKOPOULOU, M.; STAUFFER, C.; SAVAKIS, C.; BOURTZIS, K. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 42, p.15042-15045, Oct. 2004.

ZABALOU, S.; APOSTOLAKI, A.; LIVADARAS, I.; FRANZ, G.; ROBINSON, A. S.; SAVAKIS, C.; BOURTZIS, K. Incompatible insect technique: incompatible males from a *Ceratitis capitata* genetic sexing strain. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, Dordrecht, v. 132, n. 3, p. 232-240, Sept. 2009.

ZABALOU, S.; APOSTOLAKI, A.; PATTAS, S.; VENETI, Z.; PARASKEVOPOULOS, C.; LIVADARAS, I.; MARKAKIS, G.; BRISSAC, T.; MERCOT, H.; BOURTZIS, K. Multiple rescue factors within a *Wolbachia* strain. **Genetics**, Austin, v. 178, n. 4, p. 2145-2160, Apr. 2008.

ZCHORI-FEIN, E.; PERLMAN, S.J.; KELLY, S.E.; KATZIR, N.; HUNTER, M.S. Characterization of a '*Bacteroidetes*' symbiont in *Encarsia* wasps (Hymenoptera: Aphelinidae): proposal of '*Candidatus Cardinium hertigii*'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 961-968, May 2004.

ZCHORI-FEIN, E.; GOTTLIEB, Y.; KELLY, S.E.; BROWN, J.K.; WILSON, J.M.; KARR, T.L.; HUNTER, M.S. A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis

and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 22, p. 12555-12560, Oct. 2001.

ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. **Fems Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 32, n. 5, p. 723-735, Aug. 2008.

ANEXO

Anexo A - Identificação das sequências provenientes dos bancos de dados NCBI para o gene citocromo oxidase I (*COI*) associadas às populações de *Diaphorina citri* (continua)

Sigla da população	Local de coleta	Número de acesso
psy1	Flórida – EUA	FJ190167.1 a FJ190171.1
psy2	Flórida – EUA	FJ190172.1 a FJ190176.1
psy3	Texas – EUA	FJ190177.1 a FJ190181.1
psy4	Flórida – EUA	FJ190182.1 a FJ190186.1
psy8	Flórida – EUA	FJ190187.1 a FJ190191.1
psy9	Flórida – EUA	FJ190192.1 a FJ190196.1
psy10	Flórida – EUA	FJ190197.1 a FJ190201.1
psy11	Flórida – EUA	FJ190202.1 a FJ190206.1
psy12	Flórida – EUA	FJ190207.1 a FJ190210.1
psy13	Flórida – EUA	FJ190211.1 a FJ190215.1
psy14	Flórida – EUA	FJ190216.1 a FJ190220.1
psy15	Flórida – EUA	FJ190221.1 a FJ190225.1
psy16	Flórida - EUA	FJ190226.1 a FJ190227.1
psy17	São Paulo - Brasil	FJ190228.1 a FJ190231.1
psy18	Flórida - EUA	FJ190232.1 a FJ190236.1
psy19	Flórida - EUA	FJ190237.1 a FJ190241.1
psy20	Flórida - EUA	FJ190242.1 a FJ190245.1
psy21	Flórida - EUA	FJ190246.1 a FJ190250.1
psy22	Flórida – EUA	FJ190251.1 a FJ190255.1
psy23	Flórida – EUA	FJ190256.1 a FJ190259.1
psy24	Puerto rico	FJ190260.1 a FJ190262.1
psy26	Java - Indonésia	FJ190263.1 a FJ190265.1
psy27	Bali- Indonésia	FJ190266.1
psy28	Bali - Indonésia	FJ190267.1 a FJ190271.1
psy29	Vietnã	FJ190272.1 a FJ190276.1
psy30	Flórida - EUA	FJ190277.1 a FJ190278.1
psy31	Flórida - EUA	FJ190279.1 a FJ190282.1
psy32	Taipei - Taiwan	FJ190283.1 a FJ190287.1
psy33	Paquistão	FJ190288.1 a FJ190292.1
psy34	Hat Yai - Tailândia	FJ190293.1 a FJ190296.1
psy35	Zhejaing - China	FJ190297.1 a FJ190299.1
psy36	Yucatan - México	FJ190300.1 a FJ190302.1
psy37	Yucatan - México	FJ190303.1 a FJ190305.1
psy38	Nuevo Leon -México	FJ190306.1 a FJ190309.1
psy39	Flórida - EUA	FJ190310.1 a FJ190311.1
psy40	República de Mauricio	FJ190312.1 a FJ190316.1
psy41	Ilha Reunião	FJ190317.1 a FJ190320.1
psy42	Brasil	FJ190321.1 a FJ190324.1
psy43	Brasil	FJ190325.1 a FJ190328.1
psy44	Brasil	FJ190329.1 a FJ190333.1
psy45	Bali- Indonésia	FJ190334.1 a FJ190336.1

Anexo A - Identificação das sequências provenientes dos bancos de dados NCBI para o gene citocromo oxidase I (*COI*) associadas às populações de *Diaphorina citri* (conclusão)

Sigla da população	Local de coleta	Número de acesso
psy46	Arábia Saudita	FJ190337.1 a FJ190341.1
psy47	Índia	FJ190342.1 a FJ190345.1
psy48	Guadalupe	FJ190346.1 a FJ190349.1
psy49	Guadalupe	FJ190350.1 a FJ190353.1
psy50	Guadalupe	FJ190354.1 a FJ190356.1
psy51	Fuzhow - China	FJ190357.1 a FJ190361.1
psy52	Fuzhow - China	FJ190362.1 a FJ190365.1
psy54	Gangzhou - China	FJ190366.1 a FJ190369.1
psy55	Flórida - EUA	FJ190370.1 a FJ190373.1