Rafael Meira Ribeiro

Wolbachia e Incompatibilidade Citoplasmática em *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus* e *A. obliqua* (Diptera: Tephritidae)

São Paulo

2009

Rafael Meira Ribeiro

Wolbachia e Incompatibilidade Citoplasmática em *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus* e *A. obliqua* (Diptera: Tephritidae)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Orientador(a): Prof[a]. Dr[a]. Denise Selivon Scheepmaker

São Paulo

2009

Ribeiro, Rafael Meira
Wolbachia e Incompatibilidade Citoplasmática em *Anastrepha* sp1 *aff. fraterculus* e *A. obliqua* (Diptera: Tephritidae)
51 páginas
Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.
1. Bactéria 2. Endossimbionte 3. Moscas-das-frutas I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof[a]. Dr.[a]. Denise Selivon Scheepmaker
Orientadora

À minha família.

Nor are new inventions of theory the only scientific events that have revolutionary impact upon the specialists in whose domain they occur. The commitments that govern normal science specify not only what sorts of entities the universe does contain, but also, by implication, those that it does not… That is why the unexpected discovery is not simply factual in its import and why the scientist´s world is qualitatively transformed as well as quantitatively enriched by fundamental novelties of either fact or theory.

(Thomas S. Kuhn, *The Structure of Scientific Revolution*, 1962)

Ille nihil dubitat qui nullam scientiam habet.

(Pereira 111)

Agradecimentos

À Prof.ª Drª Denise Selivon Scheepmaker e ao Prof. Dr. André Luiz Paranhos Perondini pelas valiosas lições acadêmicas e por terem sido muito mais que orientadores.

À Elzi pela indispensável ajuda no manejo das populações de moscas-das-frutas e pelos momentos agradáveis durante as pausas para o almoço.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Evolutiva e Desenvolvimento de Insetos: Roberto, Rominy e Leandro, em especial, ao último, pelo auxílio na execução de alguns protocolos.

Aos amigos de graduação: Arthur, Erika, Ricardo, Fabíola e Henrique pela companhia e pelo compartilhamento das dificuldades e outras atribulações inerentes à atividade discente.

À minha família, em especial, ao meu pai e à minha avó paterna. por terem me proporcionado suporte afetivo e financeiro.

À Denise, minha namorada, por tantos anos de paciência, planos e por todo amor do mundo em troca de outro tanto.

À família Cocchi por ter me acolhido como um dos seus, incondicionalmente.

A todo professor desta universidade que de algum modo me inspirou entusiasmo pela atividade que realiza.

À todo aquele que mesmo anonimamente contribui para e grandeza e excelência desta universidade.

Trabalho realizado com o apoio financeiro da
FAPESP (Projeto Temático, proc. 03/02698-3)

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....1
I.1 *Wolbachia*.....1
I.2 Família Tephritidae e o gênero *Anastrepha*.....6

II. OBJETIVOS.....11
II.1 Geral.....11
II.2 Específicos.....11

III. MATERIAL E MÉTODOS.....12
III.1 Espécies e locais de coleta.....12
III.2 Caracterização de *Wolbachia* por PCR e seqüenciamento.....12
III.3 Estimativa da densidade populacional de bactérias
nos embriões de *Anastrepha*.....14
III.4 Estabelecimento de linhagens isentas (curadas) de *Wolbachia*
por tratamento térmico e pelo antibiótico tetraciclina.....16
III.5 Análise da incompatibilidade reprodutiva entre
A. obliqua e *A*. sp1.....16

IV. RESULTADOS.....19
IV.1 Caracterização de *Wolbachia* por PCR e seqüenciamento.....19
IV.2 Estimativa da densidade populacional de bactérias
endossimbiontes nos embriões de Anastrepha.....19
IV.3 Eliminação de *Wolbachia* pela tetraciclina e por
tratamento térmico.....23
IV.4 Análise da incompatibilidade reprodutiva entre *A. obliqua* e *A*. sp.1 25

V. DISCUSSÃO.....31

VI. CONCLUSÕES.....38

VII. RESUMO.....39

VIII. ABSTRACT.....41

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....43

X.
ANEXO.....52

I. INTRODUÇÃO

I.1 *Wolbachia*

As bactérias *Wolbachia* são α-proteobactérias da ordem Rickettsiales gram-negativas, comumente encontradas em tecidos reprodutivos de artrópodes e são citoplasmaticamente herdadas (Werren, 1997). Essa bactéria intracelular foi primeiramente observada em tecidos reprodutivos de *Culex pipiens* por Hertig e Wolbach (Hertig & Wolbach,1924 apud Werren, 1997). Posteriormente, análises baseadas na seqüência de DNAr 16S indicaram que o gênero *Wolbachia* forma um clado específico, mas existem controvérsias se esse clado é mono ou polifilético (O'Neill, *et al.*, 1992, Werren, 1997). Análises moleculares demonstraram, no gênero *Wolbachia,* a existência de dois grandes grupos (assim denominados pela ausência de uma descrição formal das espécies) que divergem em apenas 2% na seqüência do gene DNAr 16S. Tais grupos foram denominados A e B e divergiram, provavelmente, há aproximadamente 50 milhões de anos (Werren, 1997).

Normalmente, as bactérias *Wolbachia* são herdadas de forma vertical através da linha materna. No entanto, essa transmissão vertical não explica o alto número de espécies infectadas por essa bactéria e, além disso, a filogenia das linhagens da *Wolbachia*, na maioria dos casos, não coincide com a filogenia de seus hospedeiros. Assim, numerosos trabalhos têm sugerido (rev. Werren & O'Neill, 1997) e outros demonstrado experimentalmente (rev. Mascarenhas, 2007) que uma transmissão horizontal (transferência intertáxons) destas bactérias entre as espécies hospedeiras deve ocorrer muito freqüentemente. Panaram & Marshall (2007), utilizando técnicas de PCR, encontraram linhagem F de *Wolbachia*, característica de nemátodes, em insetos ortópteros (*Orocharis saltator* e *Hapithus agitator*; Gryllidae: Eneopterinae). Isso indica que também pode ocorrer transmissão horizontal entre clados filogeneticamente distantes como nemátodes e artrópodes.

Recentemente, pesquisas com transinfecção lançaram uma luz sobre o mecanismo de transmissão horizontal. Em adultos de *Drosophila melanogaster*, observou-se que a introdução de bactérias na cavidade abdominal de fêmeas

não infectadas levava à detecção da *Wolbachia* no SSCN (“Somatic Stem Cell Niche”) presente no gemário (Frydman *et al.*, 2006). É possível que as endobactérias que tem como alvo o SSCN tenham sido selecionadas por ser este um tecido com baixa taxa de divisão celular permitindo o acúmulo de bactérias no citoplasma destas células, O contato dessas células com a linhagem germinativa, favoreceria a sua transmissão vertical (Pfarr & Hoerauf, 2006).

O seqüenciamento de *wsp* ("*Wolbachia* surface protein"), um gene altamente variável utilizado para reconhecimento e filogenia de grupos da referida endobactéria (como exemplos, Sun *et al.*, 2007; Jamnongluk *et al.*, 2002), demonstrou que o supergrupo A de *Wolbachia pipientis* pode ser dividido em oito subgrupos, e o grupo B em quatro (Zhou *et al*, 1998). Além disso, considera-se atualmente a existência de supergrupos C e D em alguns nemátodes, em colembolas e em um grupo F de térmitas (Lo *et al.*, 2002).

No entanto, a análise de seqüência de *wsp* de diversas linhagens indicou a presença de quatro regiões hipervariáveis (HVR) separadas por regiões altamente conservadas. Tais análises revelaram o embaralhamento de domínios de aminoácidos dentro das HVRs, com recombinação ocorridas entre *Wolbachia* de supergrupos distintos encontrados em artrópodes. Isso indica a natureza em mosaico do gene *wsp* (Baldo *et al.*, 2005) e a inconveniência da utilização apenas deste gene com finalidades taxonômicas (Baldo & Werren, 2007, como exemplo de uma filogenia de supergrupos de *Wolbachia,* utilizando seqüenciamento de outros genes). Assim, análises moleculares filogenéticas recentes utilizando seqüenciamento dos genes *ftsZ*, *groEL, gltA* e *dnaA* mantiveram a nomenclatura dos grupos já explicitados, com diferenças no grupo F, que passou a ser denominado H e a inclusão do grupo F, comum a artrópodes e nemátodes. O grupo G foi detectado em em aranhas (Lo *et al.*, 2007).

Estima-se que entre 20-70% das espécies de insetos estejam infectadas com *Wolbachia* e a taxa de infecção difere relativamente pouco em regiões geográficas distintas como Panamá, Grã-Bretanha e Estados Unidos (Werren & Windsor, 2000; Jeyaprakash & Hoy, 2000). Recentemente, amostras de insetos da Mata Atlântica foram analisadas quanto à presença de bactérias *Wolbachia*, indicando um nível de infecção de 45% (Lavagnolli *et al.*, 2005). Hilgenboecker

et. al. (2008) estima que a proporção de espécies infectadas seja de 66% e que a taxa de infecção por espécies é geralmente ou muito alta (acima de 90%) ou muito baixa (menor que 10%), embora a proporção de indivíduos infectados possa variar ao longo do tempo. Por exemplo, Hoffman *et al*. (1998) demonstraram que a freqüência de infecção em *D. melanogaster* se mantém constante em populações de laboratório quando a densidade de larvas é pequena, mas esta taxa diminui quando há elevada densidade de larvas.

A elevada taxa de infecção de insetos por *Wolbachia* e o seqüenciamento do seu genoma permitiram a atual constatação da transmissão lateral ou horizontal de genes entre a endobactéria e hospedeiro. Kondo *et al.* (2002) observou 12 ORF´s (Open Reading Frame) de *Wolbachia*, totalizando aproximadamente 11 kb no cromossomo X do coleóptero *Callosobruchus chinensis*. Nikoh *et al.* (2008). A localização de genes de *Wolbachia* na região proximal do braço curto do cromossomo X de *C. chinensis*, não encontrados em espécies de coleópteros filogeneticamente próximas, indica que tal fenômeno da transmissão horizontal deve ter ocorrido após o evento de especiação nesses insetos.

Em embriões de *Drosophila* infectados por *Wolbachia*, observou-se que essas bactérias se concentram no pólo posterior, local de formação das células germinativas e tal localização permite à bactéria ser transmitida verticalmente e alterar aspectos reprodutivos de seus hospedeiros (Hadfield & Axton, 1999; Selivon *et al.*, 2002). Entre as alterações reprodutivas nos hospedeiros destacam-se a promoção de incompatibilidade citoplasmática (Breeuwer, 1997; Keller *et al*., 2004), partenogênese em espécies haplodiplóides e mais raramente, em espécies diplodiplóides (Koivisto & Braig, 2003; Werren, 1998), feminilização de machos genéticos (Rousset *et al*., 1992) e morte dos machos durante a embriogênese (Hurst, 1999). Além disso, em algumas espécies, a *Wolbachia* parece ser necessária para a oogênese (Dedeine *et al*., 2001). No entanto, em alguns hospedeiros, a *Wolbachia* parece ser uma característica neutra, já que não causa incompatibilidade citoplasmática (Charlat *et al*., 2004).

Utilizando como modelo embriões de *D. simulans*, Kose & Karr (1995) propuseram a interação entre *Wolbachia* e os microtúbulos da célula hospedeira, o que explicaria a sua distribuição equitativa em direção aos pólos do fuso durante a mitose e a localização desses endossimbiontes no córtex do

embrião durante a blastoderme, ou seja, na região do embrião organizada pelos microtúbulos.

De alguma forma, as células hospedeiras devem liberar fatores que regulam a densidade de bactérias minimizando, assim, os efeitos negativos ao hospedeiro (Mouton *et al.*, 2003). Utilizando transfeccção da linhagem “popcorn” de *Wolbachia* (cujas características distintas são a sua capacidade de replicação superior às demais linhagens e a diminuição do tempo de vida de seu hospedeiro) entre *D. melanogaster* e *D. simulans*, McGraw *et al.* (2002) propõem que deve ocorrer uma forte seleção nos mecanismos controladores da multiplicação das bactérias devido ao sucesso reprodutivo das moscas infectadas.

A incompatibilidade citoplasmática (IC) causada por *Wolbachia* é classificada em unidirecional e bidirecional (Werren, 1997). Quando um espermatozóide de macho infectado fertiliza um óvulo de fêmea não-infectada, o resultado é a incompatibilidade unidirecional. Quando ocorre o contrário, ou seja, a fêmea é infectada e o macho não, o zigoto formado pela fusão desses dois gametas é viável. A incompatibilidade citoplasmática bidirecional ocorre quando machos e fêmeas são infectados com diferentes linhagens de *Wolbachia*. Os resultados indicam que devem existir dois "fatores" atuando na IC mediada por *Wolbachia*, um atuando nos machos e outro nas fêmeas (Werren, 1997).

Postula-se que durante a espermiogênese, os cromossomos paternos sofram alguma forma de "marcação" (conhecido como sistema *mod*) pela ação de fatores secretados pelas bactérias. Assim, para que o processo de mitose no zigoto se complete, o ovo também deve estar infectado por uma bactéria da mesma linhagem que, ao liberar um outro fator, realiza um processo de "recuperação" (conhecido como sistema *rescue*) dos cromossomos paternos, viabilizando a singamia e o processo reprodutivo (Bourtzis & O´Neill, 1998). De fato, as bactérias não precisam estar em contato com os espermatócitos ou espemátides para modificá-los. *Clark et al.* (2008), observaram que em besouros da espécie *Chelymorpha alternans* e em vespas da espécie *Nasonia vitripennis*, a *Wolbachia* é encontrada abundantemente em outras camadas dos testículos, ao invés de próxima ao esperma ou nas células do cisto. Isso pode

indicar que a modificação do pró-núcleo masculino se dá através de múltiplas membranas ou que atua a jusante na espermiogênese.

Breeuwer & Werren (1993) propõem que a diferença de densidade de *Wolbachia* entre machos e fêmeas também podem causar IC. Utilizando como modelo vespas do gênero *Nasonia* e uma dieta misturada à tetraciclina, esses pesquisadores propõem o modelo de "dosagem bacteriana", segundo o qual o "esperma será incompatível com o ovócito quando o número de bactérias na linhagem do macho é superior ao da linhagem da fêmea". De fato, a dosagem ou densidade bacteriana pode ser estimada em populações através da contagem de bactérias nos embriões (Breeuwer & Werren, 1993) ou através de PCR quantitativo (Sinkins *et al.*, 1995). Estes últimos encontram diferenças de dosagens em populações incompatíveis de *Aedes albopictus*, segundo o "modelo de dosagem", mas não descartaram a possibilidade da incompatibilidade citoplasmática ser causada por infecção por mais de um subgrupo de *Wolbachia* em uma das populações.

Foi sugerido que a perda da coordenação temporal entre os pró-núcleos masculino e feminino durante a primeira mitose é a causa da incompatibilidade. *Wolbachia* pode gerar tal assincronia entre o material genético de origem paterna e de origem materna, segundo observado por Tram & Sullivan (2002).

Em termos populacionais, o efeito da incompatibilidade citoplasmática é a redução do fluxo gênico entre populações (Turelli, 2000) e por isso tem sido considerado que as bactérias do gênero *Wolbachia* podem ter um papel relevante no processo de especiação (Werren 1998; Telschow *et al*., 2005ab).

Demonstrações de que essas bactérias são as responsáveis pela incompatibilidade reprodutiva foram obtidas em várias espécies onde os endossimbiontes foram eliminados pela ação de antibióticos (Breeuwer & Werren, 1993; Hariri *et al*., 1998; Jiggins *et al*., 2001; Koukou *et al*., 2006) ou por tratamentos térmicos (Bourtzis & O´Neill, 1998; Werren, 1997).

Admitindo-se a possibilidade de dois tipos de isolamento reprodutivo entre espécies relacionadas, a saber, pré-zigótico, ou pré-cópula, e pós-zigótico, ou pós-cópula (Dobzhansky, 1937), a incompatibilidade citoplasmática uni e bidirecional gerada pela *Wolbachia* estaria incluída no segundo grupo, já que gera uma diminuição da viabilidade do híbrido. Em adição à esse mecanismo, Koukou *et al*. (2006) demonstraram que em populações de *D.*

melanogaster submetidas à pressões seletivas diversas, *Wolbachia* e/ou outras bactérias endossimbióticas incrementam também o isolamento reprodutivo pré-zigótico, com alterações no comportamento sexual, ou seja, através do aumento da discriminação sexual entre os indivíduos envolvidos.

I.2 Família Tephritidae e o gênero *Anastrepha*

Dentre os insetos infectados por *Wolbachia*, estão aqueles da família Tephritidae. Várias espécies dessa família são conhecidas como as verdadeiras moscas-das-frutas, uma vez que seu desenvolvimento larval ocorre em frutos. Estas moscas completam seu desenvolvimento em quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto. O ciclo de vida pode ser descrito da seguinte forma: há o acasalamento seguido de ovoposição no fruto; as larvas eclodem e consomem o fruto; o fruto cai para o solo onde ocorre a ecdise pupal, a metamorfose, que culmina com a emergência dos adultos; após a maturação sexual há novamente o acasalamento (Salles, 2000).

Muitas das espécies moscas-das-frutas atacam frutos de valor comercial, o que as qualifica como insetos-praga no cenário mundial. As espécies-praga restringem-se aos gêneros *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Ceratitis*, *Dacus*, *Rhagoletis* e *Toxotrypana* (White & Elson-Harris, 1992).

O gênero *Anastrepha* é endêmico da América e contém aproximadamente 200 espécies descritas, sendo que 99 ocorrem no Brasil (Zucchi, 2007). Análises morfológicas (Norrbom *et al.*, 1999) e da região hipervariável do gene *period* (Barr *et al.*, 2007) indicam que há 17 grupos infragenéricos.

Do ponto de vista econômico uma das espécies mais relevantes na América do Sul é *Anastrepha fraterculus sensu lato* (mosca-das-frutas Sul Americana) que utiliza uma ampla gama de frutos hospedeiros e ocorre nas Américas entre as latitudes 35°N e 35°S (Malavasi *et al*., 2000). O fato de terem uma enorme gama de frutos hospedeiros, ou seja, mais de 90 (Malavasi, 2000; Zucchi, 2007), pode ser um reflexo da existência de diversas espécies crípticas não reconhecidas (Selivon *et al.*, 2004a b). A existência de extensa

variação morfológica nas asas dessa espécie foi considerda por Stone (1942) como devida a raças geográficas. Desde então, diversos estudos sugeriram a existência de espécies crípticas, o complexo *Anastrepha fraterculus* (rev. Aluja, 1994, Selivon & Perondini, 2007).Utilizando o gene mitocondrial citocromo oxidase I (*COI*) em 15 espécies do gênero, sendo 12 do grupo *fraterculus*, Smith-Caldas *et al.* (2001) encontraram diversas entidades de *A. fraterculus* em diferentes regiões do Brasil e das Américas andina e central.

A análise de 19 locos de isozimas indicou a existência de duas entidades de *A. fraterculus*, uma delas encontradas em maiores altitudes e a outra encontrada na região litorânea. Tais resultados foram confirmados por análises cromossômicas e morfométricas da asa e do ovopositor, sendo, então, caracterizadas duas espécies, *A*. sp.1 *aff. fraterculus* e *A*. sp.2 *aff. fraterculus* - a seguir referidas simplificadamente como *A*. sp.1 e *A*. sp.2 (Selivon, 1996; Selivon *et al.*, 2005). Foram descritas, além dessas, duas outras espécies crípticas, a primeira encontrada no litoral e planalto das regiões sul e sudeste (*A*. sp.3 *aff*. *fraterculus*) e a segunda encontrada em Guayaquil, Equador (*A*. sp.4 *aff. fraterculus*) (Selivon, 2004a,b). A clivagem do DNA total com endonucleases de restrição, demonstrou haver padrões distintos entre *A*. sp.1, *A*. sp.2 e *A*. sp.3, sendo que o padrão da *A*. sp.3 é o mais distinto (Rocha & Selivon, 2004).

Análises morfométricas subsequentes do acúleo, ovopositor, asas e mesonoto de amostras populacionais de *A*. *fraterculus s.l.* de regiões do México, Argentina, Colômbia e Brasil indicaram que há diferenças significativas nas asas e acúleo entre populações mexicanas e brasileiras (Hernández-Ortiz *et al.*, 2004). Esses pesquisadores propõem a existência de três morfotipos: mexicano, andino (representado pela amostra colombiana) e brasileiro (incluindo as populações brasileiras e argentina).

A análise das seqüências espaçadoras ITS1 ("Internal Transcribed spacer") do DNA ribossômico, corroborou a hipótese de que há três espécies de *Anastrepha fraterculus* no Brasil (*A*. sp.1, *A*. sp.2 e *A*. sp.3) e pelo menos outra no Equador (*A*. sp.4). No Brasil, as amostras apresentaram 90% de similaridade na seqüência do ITS1, sendo que *A*. sp.1 apresentou maior similaridade com *A*. sp.2 do que ambas com *A*. sp.3 (Prezotto, 2008). Quando amostras da Região Neotropical, Argentina, Peru, Colombia, Guatemala e

México e Brasil, foram consideradas para o estabelecimento das relações filogenéticas, observou-se que no clado *A. fraterculus s.l.* há a separação entre as amostras do México e Guatemala das demais e dentre estas, há tres subgrupos, o primeiro formado por amostras de Peru e Equador, outro pela amostra da Colômbia e outro formado por Brasil e Argentina. A heterogeneidade de seqüências nas amostras da Região Neotropical, indica que possivelmente existem outras espécies no complexo *fraterculus* (Prezotto, 2008).

O complexo *fraterculus* integra, juntamente com outras 27 espécies, o grupo intragenérico *fraterculus*. A esse grupo pertence a maioria das espécies pragas do gênero *Anastrepha*, as quais, em geral, são generalistas quanto à utilização de recursos. Esse é o caso de *A. obliqua* (a mosca-das-frutas das Antilhas) que tem uma ampla lista de frutos hospedeiros registrados, cerca de 70 entre espécies de Annonaceae, Bignoniaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Myrtaceae e Rosaseae(White & Elson-Harris, 1992) e além dessas, espécies de Malpighiaceae, Oxalidaceae e Combretaceae (Malavasi *et al.*, 2000). Entretanto, essa espécie ataca preferencialmente os frutos da família Anacardiaceae, entre elas, manga, cajá, cajá-mirim, umbu, cajarana e serigüela (Zucchi, 2007). Do ponto de vista biogeográfico, *A. obliqua* tem distribuição similar à *A. fraterculus*, sendo a segunda espécie mais comum na maior parte das localidades onde ocorre, com exceção do sul do Caribe e Suriname (Zucchi, 2007). Do ponto de vista morfológico, é possível diferenciar entre adultos de *A. obliqua* e do complexo *A. fraterculus* pelo acúleo do ovipositor, padrão alar e do mesonoto. Os ovos de *A. obliqua*, possuem um apêndice respiratório, contendo aerópilas em sua extremidade (estruturas que permitem as trocas gasosas porque são comunicações entre o meio externo e os espaços internos do córion) e na sua base, a micrópila (orifício que permite a entrada do espermatozóide). Já os ovos das espécies caracterizadas do complexo *fraterculus* não apresentam o apêndice respiratório em sua extremidade (Murillio & Jirón, 1994; Selivon & Perondini, 2000).

Do ponto de vista taxonômico, as espécies *A. obliqua* e as espécies do complexo *fraterculus* são distintas. No entanto, elas são capazes de copular e gerar híbridos férteis em condições de laboratório, embora não seja possível afirmar a ocorrência de hibridação na natureza (Santos *et al*., 2001), apesar da

ampla área de coexistência entre ambas (Malavasi *et al.*, 2000). Segundo Santos *et al.* (2001), há maior isolamento entre *A. fraterculus* e *A. obliqua* e entre *A. sororcul*a e *A. obliqua,* do que entre *A. fraterculus* e *A. sororcula*, indicando uma possível maior proximidade filogenética entre estas do que com *A. obliqua*.

Estudos sobre a progênie híbrida obtida dos cruzamentos entre *A. obliqua* e as espécies do complexo *fraterculus* indicaram que esta é variável de acordo com os diferentes arranjos dos tipos parentais, de acordo com a regra de Haldane (1922), segundo a qual "quando um dos sexos dos híbridos F1 resultantes do cruzamento entre duas espécies é estéril ou inviável, este é quase sempre o heterogamético". Por exemplo, o cruzamento entre *A*. sp.2 *aff. fraterculus* e *A. obliqua* produz apenas fêmeas ou não produz descendentes, dependendo se a fêmea parental é sp.2 ou *obliqua* respectivamente, enquanto que o cruzamento entre *A*. sp.1 e *A. obliqua* produz machos e fêmeas, ou só fêmeas, a depender da fêmea parental ser *obliqua* ou sp.1, respectivamente (Santos *et al.* 2001). Reduções nas taxas de eclosão de larvas e desvios na proporção sexual da progênie adulta foram previamente observados em cruzamentos entre A. sp.1 e A. sp.2 (Selivon *et al.* 1999, 2005). Esses autores invocaram um possível efeito causado por *Wolbachia* para explicar esses resultados, uma vez que a infecção em A. sp.2 já era conhecida (Selivon *et al.* 2002).

A ocorrência de *Wolbachia* está descrita em várias espécies de *Anastrepha, A.* sp.1, *A.* sp.2, *A.* sp.3, *A.* sp.4, *A. amita*, *A. distinta*, *A. bistrigata, A. grandis, A. macrura*, *A. montei*, *A. obliqua*, *A. pickeli, A. serpentina*, *A. sororcula*, *A. striata* e *A. turpinae* (Werren *et al*., 1995; Selivon *et al*., 2002; Coscrato, 2006; Mascarenhas, 2007) e também em outros gêneros de moscas-das-frutas de outros gêneros, *Rhagoletis* (Riegler & Staufer 2002), *Bactrocera* (Kittayapong *et al*., 2000; Jamnongluk *et al*., 2002; Sun *et al.*, 2007) e *Ceratitis capitata* (Rocha *et al*., 2005).

O fenômeno de incompatibilidade citoplasmática relacionado com a presença de *Wolbachia* foi demonstrado em *Rhagoletis cerasi* (Riegler & Staufer 2002) e em *C. capitata* (Zabalou *et al*., 2004). Tais resultados levaram a perspectiva de utilização desses endossimbiontes em técnicas de controle desses insetos-praga, similares aos princípios do TIE (Técnica do Inseto

Estéril), onde a redução populacional seria feita pela liberação de machos infectados com linhagens de bactérias distintas das populações naturais (ou simplesmente machos infectados em relação às populações naturalmente isentas de *Wolbachia*) em lugar de machos esterelizados por radiação (Beard *et al*., 1993; Zabalou *et al*., 2004).

A presença de *Wolbachia* em moscas-das-frutas aliada a possibilidade de obtenção de progênie híbrida entre *A. obliqua* e *A*. sp.1 *aff. fraterculus* em condições de laboratório, indicam ser esse um excelente material biológico para avaliar-se alterações reprodutivas associadas à presença dessa bactéria.

II. OBJETIVOS

II.1 Geral

- Avaliar o efeito da bactéria *Wolbachia* em aspectos reprodutivos nas moscas-das-frutas *A. obliqua* e *A*. sp.1 *aff. fraterculus*.

II.2 Específicos

- Caracterizar as linhagens de *Wolbachia* presentes em *A*.sp.1 *aff. fraterculus* e *A. obliqua*;
- Analisar a densidade populacional das bactérias em amostras de embriões de *A*. *obliqua* e *A*. sp.1;
- Obter linhagens de *A. obliqua e A. sp.1* isentas (curadas) de *Wolbachia* por tratamento térmico ou por antibiótico;
- Descrever os resultados de cruzamentos envolvendo as espécies *A. obliqua* e A. sp.1 *aff fraterculus* quanto às taxas de eclosão e da emergência e proporção sexual da progênie adulta;
- Verificar o tipo de progênie obtida em cruzamentos intra-específicos de *A. obiqua* e de *A.* sp.1 infectadas por *Wolbachia*;
- Verificar o tipo de progênie obtida em cruzamentos intra-específicos de *A. obliqua* e de *A.* sp.1 isentas (curadas) de *Wolbachia*;
- Verificar o tipo de progênies obtidas em cruzamentos interespecíficos de *A. obliqua* e de *A.* sp.1 curadas ou infectadas por *Wolbachia*;

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1 Espécies e locais de coleta

As populações de *A*. sp. 1 *aff*. *fraterculus* foram estabelecidas a partir de indivíduos coletados em goiabas (*Psidium guajava*) no município de Santa Isabel, SP (23°18´S / 46°14´W).

As populações de *A. obliqua* foram estabelecidas a partir de indivíduos coletados em carambola (*Averrhoa carambolae*) no município de Vargem Grande do Sul, SP (21°50´S / 46°53´W)

Os frutos infestados foram trazidos ao laboratório, as pupas coletadas e mantidas até a emergência do adultos por metodologia estabelecida anteriormente (Selivon, 1996). Com esses adultos foram estabelecidas colônias em caixas de população de 30x30x40cm, mantidas em sala com controle de temperatura a 25ºC, umidade relativa de 70±5%, fotoperíodo natural e dieta preparada com os seguintes ingredientes: 10ml de mel, 30 ml de hidrolisado de proteína de milho, 0,5g de Levemil®, 6g de Levedo de cerveja, 0,5 de Sustagem®, 25g de açúcar mascavo e 45g de açúcar branco. A água foi fornecida através de um tira de esponja de celulose (Chamex®) que permanece constante embebida por ficar inserida em um recipiente com água. Para a oviposição, foram fornecidos frutos, mamão para *Anastrepha* sp1 *aff. fraterculus* e manga para *A. obliqua*. Uma semana depois, os frutos eram retirados e acondicionados em recipientes com vermiculita até a obtenção de pupas. Estas foram transferidas para as caixas acrílicas onde emergiram e permaneceram os adultos (Selivon, 1996).

III.2 Caracterização de *Wolbachia* por PCR e seqüenciamento

O DNA total foi extraído segundo protocolo adaptado de Jowett (1986), o qual é brevemente descrito a seguir. Indivíduos adultos armazenados em

nitrogênio líquido, foram colocados individualmente em tubos de polipropileno de 1,5ml em 200µl de solução de homogeneização [Tris_HCl 10 mM (pH=7,5), NaCl 60 mM, EDTA 50 mM] e após maceração, foi acrescentado o mesmo volume de solução de lise [SDS 1,25%, Tris-HCl 0,3M (pH=9,0), EDTA 0,1M, sacarose 5%]. Foram adicionados 2µl de Proteinase K (100µg/ml), seguindo-se incubação por uma hora a 65°C. Após esses procedimentos, foram acrescentados 120µl de acetato de potássio 8M, seguindo-se incubação em gelo por 45 minutos. Após esse procedimento, o material foi centrifugado (10min, a 20000G,a 4°C), seguindo-se à precipitação com etanol absoluto e centrifugação por 5 min a 20000G, a temperatura ambiente para precipitação do DNA. O precipitado foi lavado em etanol 70% e, após secagem, a solução final foi ressuspendida em 30µl de TE [10mM Tris-HCl, pH=8,0); 1mM EDTA] e armazenada a -20°C. Para eliminar o RNA, as amostras foram tratadas com RNase (Ribonuclease A, Sigma) a uma concentração final de 100µg/ml, durante uma hora, a 37°C. Para atestar a presença de *Wolbachia*, foram feitas reações de PCR, utilizando-se os iniciadores específicos de *Wolbachia wsp* 81F (5´TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC3´) e *wsp* 691R (5´AAAAATTAAACGCTACTCCA3´) da região do gene *wsp* codificador de uma proteína de membrana destas bactérias (Zhou *et al*., 1998). Nos casos negativos, as mesmas amostras de DNA foram testadas para amplificação de uma porção do gene ribossômico eucariótico 28S rDNA, utilizando-se os iniciadores 28SF3633 (5´TACCGTGAGGGAAAGTTGAAA3´) e 28SR4076 (5´AGACTCCTTGGTCCGTGTTTT3´) com o intuito de testar a qualidade do DNA utilizado para a detecção das bactérias por PCR. Caso essa amplificação também fosse negativa, foram testadas outras concentrações de DNA para amplificação, conforme descrito por Werren *et al*. (1995). Caso fosse necessário, novas extrações de DNA foram feitas para que fosse excluída a possibilidade de que a ausência de fragmentos amplificados fosse devido a uma amostra de DNA degradado. As reações de PCR (“Polymerase Chain Reactions”) tiveram volume final de 20µl com as seguintes proporções: 13,25µl de H_2O, 2µl de Tampão de Reação 10x (BIOTOOLS), 0,5µl de dNTPs (10mM), 0,5µl de cada iniciador (20µm) e 0,5 unidades de polimerase de DNA (Taq) (BIOTOOLS) e 3,0µl de amostra. Para as amplificações foram utilizada a configuração: 94°C 1min, 55°C 1 min e 72°C 1min por 35 ciclos e para a

amplificação do 28S rDNA eucariótico a configuração 94°C 2min, 38 ciclos de 94°C 30s, 58°C por 50s e 72°C por 1m30s, e 72°C 10min (Werren & Windsor, 2000).

Para determinar a presença e o tamanho do fragmento amplificado, uma alíquota de cada amostra foi analisada em gel de agarose a 1% em tampão TAE. A eletroforese foi realizada em cubas horizontais com solução tampão de corrida TAE 1x sob corrente elétrica alternada a uma tensão de 0,6A, 5V/cm de gel. O gel foi corado com brometo de etídio a 5µg/ml, examinado sob luz ultravioleta e fotografado com câmera digital.

Os fragmentos de *wsp* amplificados foram purificados seguindo o protocolo Perfect Gel Cleanup® (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e seqüenciados em seqüenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems). Reações de seqüenciamento foram montadas seguindo as seguintes proporções: 2µ de Tampão 10x (BIOTOOLS®), 0,5µl dNTPs, 10mM (GIBCo®), 0,5µl de iniciador 20µM (81F ou 691R), 0,5 unidade de polimerase de DNA (Taq) (BIOTOOLS®), 3µl de amostra de DNA e H_2O até 20µl.

As seqüências obtidas foram analisadas através do Bioedit® e as seqüências consenso comparadas com sequências de *Wolbachia* de depositadas no NCBI.

III.3 Estimativa da densidade populacional de bactérias nos embriões de *Anastrepha*

Os ovos e embriões de *A*. sp.1 e *A. obliqua*, foram obtidos por técnica já estabelecida no laboratório (Selivon *et al*., 1996). Para as fêmeas depositarem os ovos, foram fornecidas semi-esferas de agar a 2% coradas por anilina vermelha e envoltas por Parafilm® "M" . Os ovos foram retirados das semi-esferas e transferidos para um lâmina escavada contendo solução de hipoclorito de sódio a 3% para a remoção do córion. Para fixação, os ovos foram submetidos a duas lavagens com PBT e transferidos para uma solução de 370 µl de paraformaldeído 4% e 370 µl de heptano, sob agitação leve por 20 min. Em seguida, foi retirado 1/3 da solução e acrescentados 500 µl de heptano

e 500µl de metanol sob agitação forte por 1 min. Após esse procedimento, foram realizadas duas lavagens com metanol. Caso ao final desse processo a membrana vitelínica não tivesse sido removida, foi retirada manualmente utilizando fita adesiva dupla-face (Wieschaus & Nüsslein-Volhard, 1986). Os embriões foram então reidratados em etanol 50%, etanol 25% e água destilada, lavados com PBT e, então, corados pelo fluorocromo DAPI (2,6-diaminofenolindole) por 10min e por fim, lavados em PBS por 1min (Selivon *et al.*, 2002).

Os embriões corados foram montados entre lâmina e lamínula para análise em microscópio equipado com epifluorescência (OLYMPUS BX60®), utilizando-se o filtro adequado para a visualização das bactérias coradas por DAPI. As imagens foram digitalizadas por uma câmara CCD (Leica DC100®) acoplada ao microscópio.

O grau de infecção foi estimado através da contagem do número de bactérias na região cortical dos embriões em estágios iniciais do desenvolvimento (divisões intravitelínicas). Essa análise foi feita utilizando-se o programa AdobePhotoshop® ajustando-se, às imagens dos embriões, uma grade com quadrados de 10µm de lado. Foram analisados cinco embriões de cada espécie e em cada um, foram amostrados cinco quadrados cujas posições foram determinadas "a priori" ao longo da linha mediana lateral dos embriões, estando o primeiro próximo ao pólo anterior, três ao longo do eixo A/P e o último próximo ao pólo posterior. A densidade populacional geral das bactérias por embrião, foi estimada pela média dos valores das cinco contagens por embrião e expressa como o número de bactérias por 100µm². Foram contabilizadas apenas as bactérias presentes no plano focal logo abaixo da superfície do embrião, dada a impossibilidade de contar as bactérias que estão imersas no interior do vitelo. Assim, o método fornece um índice relativo da densidade de bactérias por embrião (Breeuwer & Werren, 1993; Selivon *et al.*, 2002). Os dados obtidos foram submetidos à uma análise de Regressão Múltipla entre a densidade de bactérias (por 100µm^2) em cada área contra a localização ao longo do eixo A/P dos embriões, utilizando-se o programa Statistica 6.0 (Statsoft Inc.).

III.4. Estabelecimento de linhagens isentas (curadas) de *Wolbachia* por tratamento térmico e pelo antibiótico tetraciclina

A eliminação de bactérias foi testada por dois métodos, ambos aplicados as colônias de *A*. sp.1 e de *A. obliqua* do laboratório.

Para tratamento pela temperatura, as pupas foram colocadas em caixas de plástico contendo vermiculita e mantidas até o momento da emergência dos adultos, em estufa cuja temperatura fora previamente fixada em 30°C, cuidado tendo sido tomado para evitar-se a dessecação. Após a emergência, os adultos foram separados em caixas de população (15 x 15 x 20 cm) e mantidos em sala com temperatura, umidade e fotoperíodo controlados, como acima descrito (Pires, 2005)

Concomitantemente, outros lotes de pupas foram isoladas de modo similar e mantidas até o momento da emergência dos adultos em sala com condições controladas. Logo após a emergência dos adultos, iniciou-se o tratamento com o antibiótico tetraciclina que foi administrado através da alimentação. A dieta, rotineiramente utilizada na manutenção das colônias foi acrescida do antibiótico a 1% (Breeuwer & Werren, 1993) e fornecida por uma semana, sendo trocada a cada dois dias.

Cada método foi avaliado quanto a capacidade de eliminar a *Wolbachia* de seu hospedeiro, através de reações de PCR utilizando os iniciadores do gene *wsp* 81F e *wsp* 691R (descritos no item III.2). O método que apresentou maior eficiência foi utilizado para obtenção das linhagens isentas de *Wolbachia* e os adultos curados foram imediatamente utilizados nos cruzamentos para os testes de incompatibilidade reprodutiva entre a *A*. sp.1 e *A. obliqua*.

III.5. Análise da incompatibilidade reprodutiva entre *A. obliqua* e *A*. sp1

As análises da incompatibilidade entre *A*. sp.1 e *A. obliqua* foram feitas utilizando-se pequenas caixas de população, 15 x 15 x 25cm, contendo de 7 a 15 casais cada uma (Selivon *et al*., 2005) e mantidas sob condições

controladas, como acima descrito. Foram feitos cruzamentos intra e inter-específicos tendo sido utilizados adultos infectados e outros derivados das pupas submetidas ao tratamento térmico, como descrito nas Tabelas I e II.

Tabela I - Cruzamentos intra-específicos realizados com *A*. sp.1 *aff. fraterculus* e *A. obliqua*

Cruzamentos	♀ *A. obliqua* x ♂ *A. obliqua*	♀ *A.* sp.1 x ♂ *A.* sp.1
1	Infectado x Infectado	Infectado x Infectado
2	Tratado x Tratado	Tratado x Tratado
3	Infectado x Tratado	Infectado x Tratado
4	Tratado x Infectado	Tratado x Infectado

Tabela II - Cruzamentos interespecíficos realizados entre *A*. sp.1 *aff. fraterculus* e *A. obliqua*

Cruzamentos	♀ *A. obliqua* x ♂ *A*.sp.1	♀ *A.* sp.1 x ♂ *A.obliqua*
1	Infectado x Infectado	Infectado x Infectado
2	Infectado x Tratado	Infectado x Tratado
3	Tratado x Infectado	Tratado x Infectado
4	Tratado x Tratado	Tratado x Tratado

Para cada cruzamento, nas progênies foram avaliadas a taxa de eclosão das larvas e a taxa de emergência e a proporção sexual da progênie adulta.

Estas análises foram feitas segundo a metodologia descrita em Selivon *et al*. (2005), a qual é sumariamente descrita a seguir. Para a coleta de ovos, foram disponibilizadas em cada caixa de população experimental, semi-esferas de agar a 2%, coloridas com anilina vermelha e revestidas por Parafilm® "M" (ver item 3). Os ovos foram retirados das semi-esferas e transferidos para uma placa de Petri, contendo uma camada de agar a 1% e mantidos a temperatura de 25°C. Cada placa foi monitorada por seis dias e as eclosões registradas. A

taxa de eclosão foi expressa como o número de larvas eclodidas do número de ovos amostrados.

Concomitantemente, foram deixados frutos nas caixas de população (mamão ou manga, dependendo se a fêmea era *A*. sp1 *aff. fraterculus* ou *A. obliqua*, respectivamente) para a posterior obtenção dos adultos. Pupas foram coletadas e mantidas até a emergência dos adultos. Após a emergência, os adultos foram separados por sexo e seu número contado. Desta forma, foram obtidas as taxas de emergência (número de adultos a partir das pupas amostradas) e a proporção sexual. Os dados obtidos das taxas de eclosão dos diferentes cruzamentos foram analisados por testes χ^2 em Tabelas de Contingência e as proporções sexuais da progênies adulta por χ^2, ambos com correção de Yates, utilizando-se o programa Statistica 6.0 (Statsoft Inc.)

IV. RESULTADOS

IV.1 Caracterização de *Wolbachia* por PCR e seqüenciamento

A amplificação do gene *wsp* através de reações de PCR gerou fragmentos de tamanho entre 500 e 600 pb (Fig. 1). Tais fragmentos indicaram a presença de *Wolbachia*, tanto em machos quanto em fêmeas, nas populações de *A. obliqua* e *A*. sp1 *aff fraterculus*.

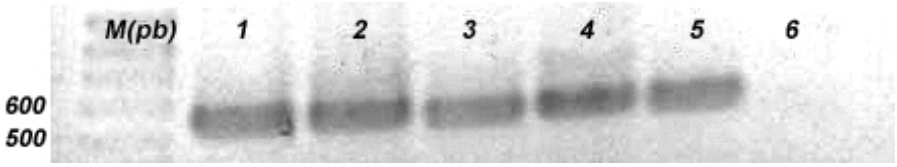

Figura 1- Fragmentos amplificados por PCR do DNA de *A. obliqua* machos (raia 1) e fêmeas (raia 2) e de machos (raia 3) e fêmeas (raia 4) de *A*. sp1. As raias 5 e 6 são os controles positivo e negativo, respectivamente.

As amostras de *wsp* foram seqüenciadas com o intuito de identificar a linhagem de *Wolbachia* que infecta as populações das duas espécies de *Anastrepha*. Reações de seqüenciamento demonstraram que as seqüências consenso obtidas de amostras de DNA de machos e fêmeas de *A.* sp1 e de *A. obliqua,* apresentaram 0,998 de similaridade com o gene *wsp* da linhagem Au de *Wolbachia* de *Drosophila simulans* (acesso no GenBank número AF290891, Charlat *et al*, 2004). As seqüências estão mostradas no Anexo.

IV.2. Estimativa da densidade populacional de bactérias endossimbiontes nos embriões de *Anastrepha*

A análise de embriões fixados e corados pelo DAPI mostrou a presença de bactérias nas populações de *A*. sp1 e *A*. *obliqua* (Fig. 2) e pode-se

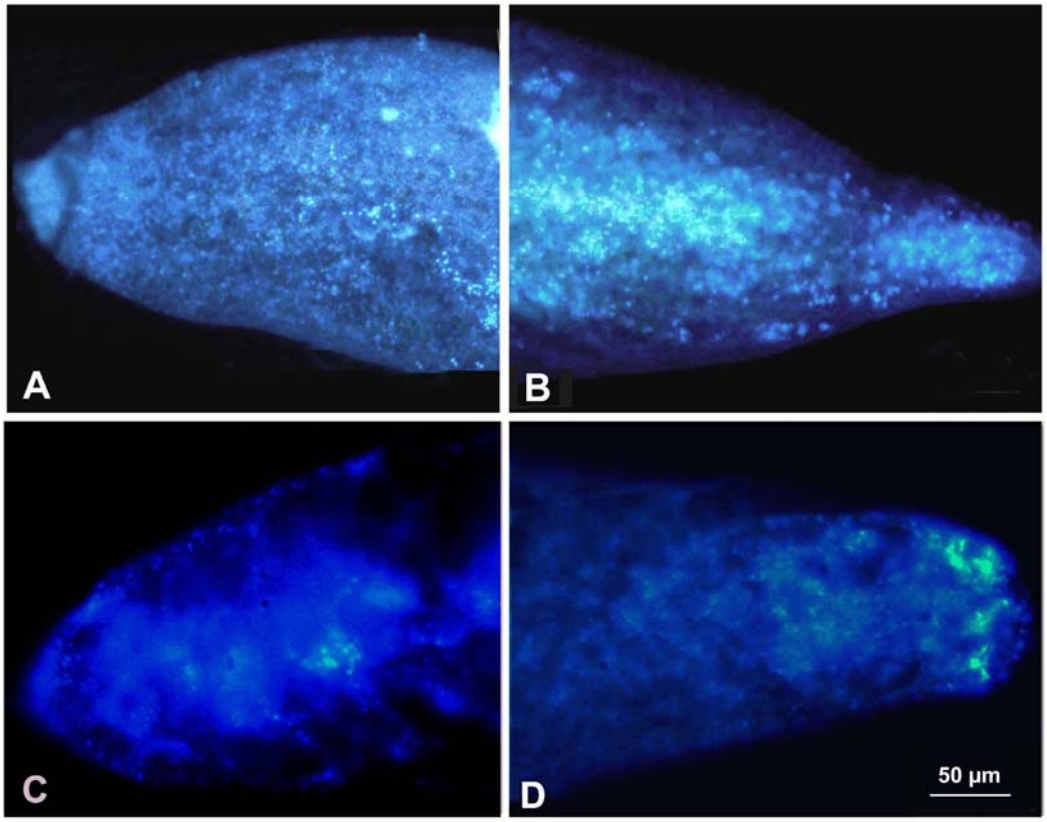

Figura 2: Fotomicrografia de fluorescência de embriões de *A*. sp.1 (A,B) e de *A. obliqua* (C,D) corados pelo DAPI. Note-se que as bactérias (pontos brilhantes) são menos freqüentes nas extremidades anteriores (A e C) que nas extremidades posteriores (B e D) dos embriões.

notar que existe, aparentemente, uma maior concentração de endossimbiontes na extremidade posterior do embrião.

Com o intuito de avaliar se essa concentração diferencial das bactérias é real e um fato generalizado entre os embriões das duas espécies de moscas-das-frutas, foi feita uma análise do número de bactérias por unidade de área ao longo do eixo antero-posterior dos embriões.

A densidade populacional das bactérias, estimada em amostras de cinco embriões de cada espécie hospedeira, em cinco áreas de 100 μm^2 distribuídas ao longo do eixo antero-posterior dos embriões, estão lançadas em gráficos na Figura 3. A densidade média geral (expressa por 100μm^2) dos cinco embriões de cada espécies, foi de 19,8 ± 21.6 para *A*. sp.1 e de 13,4 ± 11,2 para *A. obiqua*. Como se pode observar na Figura 3, existe uma tendência de decréscimo na densidade do pólo posterior dos embriões para a extremidade anterior e que, nessas amostras, existe menor dispersão dos valores em cada área entre os embriões de *A.obliqua* que entre os embriões de *A.* sp.1. Realmente, uma análise de regressão múltipla mostrou que existe uma correlação significativa entre a densidade populacional de bactérias e as regiões ao longo do eixo A/P dos embriões, decrescendo do pólo posterior para o anterior, tanto em *A. obliqua* (R = 0,798, g.l. = 1, 23; F= 40,36; P<0.001) como para *A*. sp.1 (R = 0,499; g.l. =1, 23; F= 5,81; P<0.024). O teste também indicou que os coeficientes de regressão (b) são significativos em *A. obliqua* (b = -6,48, g.l. = 23; t = -6,35; P<0.001) e em *A*. sp.1 (b = -6,74; g.l. = 23; t = -2,41; P= 0,024), como mostra as retas traçadas na Figura 3.

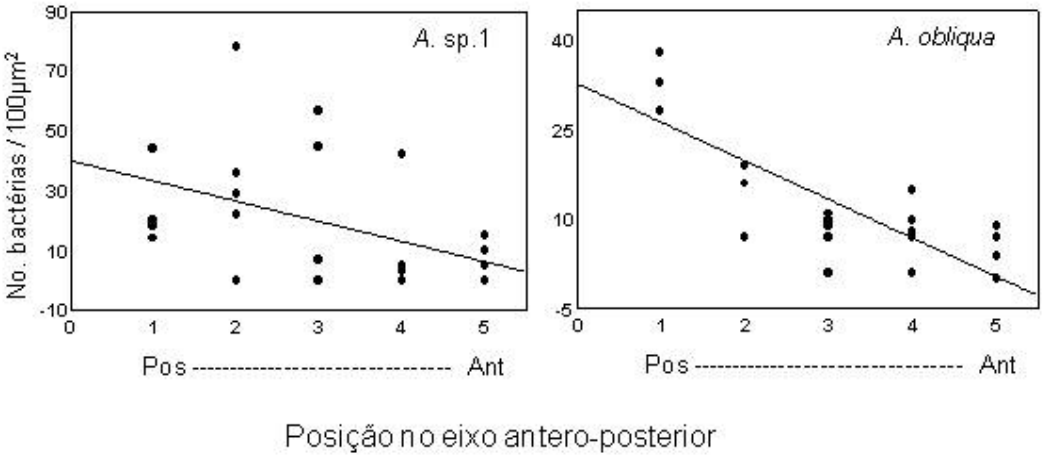

Figura 3. Correlações entre a densidade da população de bactérias em áreas de 100µm² e a localização dessas áreas ao longo do eixo longitudinal do embrião. As retas de regressão foram traçadas por análise de regressão múltipla, sp.1: Y = 40,02 – 6,74X; A. obliqua: Y = 32,8 – 6,48X.
Pos = pólo posterior; Ant = pólo anterior.

IV.3. Eliminação de *Wolbachia* pela tetraciclina e por tratamento térmico

Amostras de DNA extraídas de adultos tratados com tetraciclina ou pelo tratamento térmico (30ºC) foram utilizadas para duas reações de PCR, a primeira com iniciadores para a amplificação do gene ribossômico eucariótico *28S* e a segunda, com iniciadores do gene *wsp* da *Wolbachia*. A primeira amplificação atesta a qualidade do DNA extraído evitando falsos resultados negativos e a segunda, atesta a presença de *Wolbachia.*

O tratamento com tetraciclina a 1% mostrou-se pouco eficiente para a eliminação de *Wolbachia* de seus hospedeiros. Das cinco amostras de DNA extraídas de indivíduos tratados, apenas em uma a sequência do gene *wsp* não foi detectada, ou seja, em apenas um indivíduo, a *Wolbachia* foi eliminada pelo antibiótico (Fig. 4, raia 2). A amplificação do gene 28S em todas as amostras indica que a ausência dessa sequência não é um falso negativo.

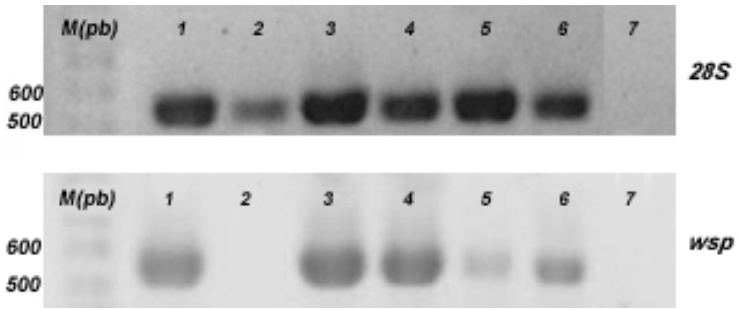

Figura 4- Fragmentos amplificados por PCR de DNA extraídos de moscas tratadas com tetraciclina a 1%. Note a ausência de fragmento de *wsp* apenas na raia 2. As raias 6 e 7 são os controles positivo e negativo, respectivamente.

Tratamento térmico

A taxa de emergência e a proporção sexual entre os adultos que se desenvolveram a partir de pupas tratadas a 30°C foram comparadas com dados de amostras de cruzamentos controles mantidos a 25°C.

A Tabela III mostra os dados para as amostras do tratamento térmico e os dados dos cruzamentos controle encontram-se na Tabela IV. Como se pode verificar, o tratamento térmico das pupas de *A. obliqua,* reduziu a taxa de emergência dos adultos de 61,7% no controle, para 31,2 %, enquanto que a redução foi de 64,4% para 43,5% em *A*. sp.1.

O tratamento térmico, no entanto, não alterou a proporção sexual entre os adultos de ambas as espécies, pois a proporção não se desviou significativamente do 1:1 esperado, como mostram os testes das Tabelas III e IV. Assim, o tratamento térmico que elimina as bactérias induz mortalidade nas pupas, mas afeta similarmente pupas de machos quanto de fêmeas.

Tabela III – Taxas de emergência e proporção sexual de indivíduos de *A*. sp.1 e *A. obliqua* emergidos em estufa a 30°C

Espécie	Emergência			Proporção Sexual					
				Machos		Fêmeas		χ^2 (Yates)	
	N	%	total	N	%	N	%	Valor	P
A. obliqua	890	31,2	278	131	47,1	147	52,9	0,81	ns
A. sp1	230	43,5	100	52	52,0	48	48,0	0,09	ns

ns: não significativo (P> 0,05)

O DNA de oito indivíduos adultos, que se desenvolveram de pupas tratadas a 30°C, foi extraído e alíquotas foram amplificadas por PCR. Como demonstra a Fig.3, apenas em uma das amostras o PCR do gene *wsp* apresentou o fragmento amplificado, ou seja, que apenas em uma amostra (raia 6) havia indício de que a *Wolbachia* não fora eliminada. A amplificação do

gene 28S dessas amostras atesta a qualidade do DNA extraído e da reação de PCR.

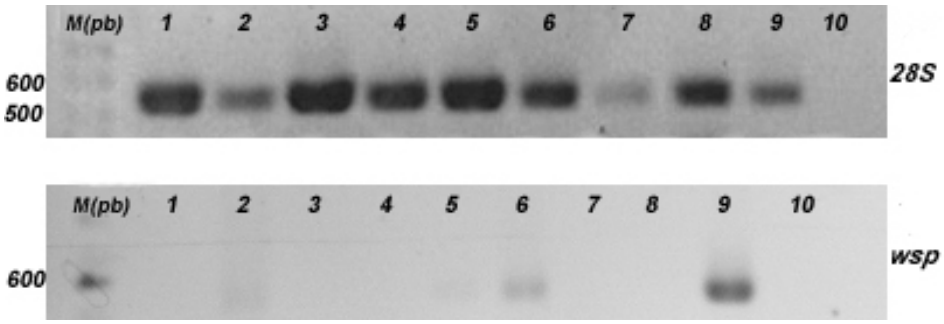

Figura 5- Fragmentos amplificados por PCR de DNA extraídos de adultos que se desenvolveram de pupas tratadas com calor (30°C). Note a presença de fragmento *wsp* apenas na raia 6. As raias 9 e 10 são os controles positivo e negativo, respectivamente.

Desta forma, o tratamento pela temperatura para a eliminação de *Wolbachia* dos hospedeiros demonstrou ser mais eficiente. Tal método foi, então, utilizado para a obtenção de moscas isentas de *Wolbachia* para os testes de incompatibilidade reprodutiva entre *A. obliqua* e *A*. sp.1, descritos a seguir.

IV.4. Análise da incompatibilidade reprodutiva entre *A. obliqua* e *A*. sp.1

O estudo da incompatibilidade reprodutiva entre *A. obliqua* e *A.* sp.1 envolveu a análise de progênies de cruzamentos intra e interespecíficos com indivíduos, de ambas as espécies, que eram infectados pela *Wolbachia* (indicados pelo sinal +) e indivíduos curados pelo tratamento térmico das pupas (indicados pelo sinal -). Foram analisadas a taxa de eclosão de larvas, a emergência e proporção sexual entre os adultos na geração F1 desses

cruzamentos. Os dados obtidos nessas análises estão mostrados na Tabela IV e representados graficamente na Figura 6.

Pela análise da Tabela IV, pode-se notar que as taxas de emergência dos diferentes cruzamentos foram variáveis, mas em níveis similares aos dos cruzamentos controle (espécies parentais), exceto no cruzamento entre fêmeas sp1- com machos obl+, onde a emergência foi mais baixa (25%). Análises da eclosão das larvas e da proporção sexual entre os adultos, serão apresentadas a seguir.

Cruzamentos intra-específicos com indivíduos infectados e/ou curados

Utilizando-se indivíduos infectados, o cruzamento entre machos e fêmeas de sp1+ e o cruzamento similar de obl+, mostram que as taxas de eclosão foram elevadas (Tabela IV, Figura 6A). Nesses cruzamentos, a proporção sexual observada entre os adultos não se desviou significativamente do 1:1 esperado (Tabela IV, Figura 6B).

Quando foram utilizados indivíduos curados, observou-se nos cruzamentos entre machos e fêmeas de sp1- e entre machos e fêmeas de obl-, uma queda significativa nas taxas de eclosão quando comparadas às taxas dos cruzamento entre indivíduos infectados (Tabela IV, Figura 6A), como mostram os teste estatísticos da Tabela V. Além disso, nota-se que o decréscimo na taxa de eclosão foi maior em *obliqua* que em *A*. sp.1. Quanto às proporções sexuais entre os adultos, repetiu-se o observado com os cruzamentos entre indivíduos infectados, ou seja, a proporção não se alterou significativamente do 1:1 esperado (Tabela IV, Figura 6B).

Em outra série de experimentos, foram feitos cruzamentos intra-específicos entre indivíduos infectados e curados, estando os dados na Tabela IV e Figura 6C. Nesses cruzamentos, quando a fêmea parental era curada mas o macho era infectado (fêmea sp1- x macho sp1+ e fêmea obl- x macho obl+), as taxas de eclosão foram significativamente menores que a dos cruzamentos recíprocos (fêmea sp1+ x macho sp1- e fêmea obl+ x macho obl-), como mostram a Figura 6C e os testes estatísticos da Tabela V. Nesses cruzamentos, as proporções sexuais não se desviaram significativamente de 1:1, exceto em

Tabela IV. Taxas de eclosão, de emergência e proporção sexual de adultos nas progênies de cruzamentos intra e interespecíficos com indivíduos infectados e curados de *A.* sp.1 e *A. obliqua*

Modalidade		Cruzamentos[a]		Eclosão			Emergência			Proporção sexual					
				Ovos	Larvas		Pupas	Adultos		Machos		Fêmeas		Teste 1:1	
		Fêmeas	Machos	N	N	%	N	N	%	N	%	N	%	X^2	P
Infectados	intra-espécies	sp1+	sp1+	33	27	81,2	247	159	64,4	73	45,9	86	54,1	0,90	ns
		obl+	obl+	220	166	66,4	120	74	61,7	40	54,1	34	45,9	0,34	ns
	interespécies	sp1+	obl+	177	16	9,0	216	146	67,6	1	0,7	145	99,3	140,0	**
		obl+	sp1+	300	30	10,0	181	133	73,5	29	21,8	104	78,2	41,2	**
Curados	intra-espécies	sp1-	sp1-	80	19	23,7	175	79	45,1	42	53,2	37	46,8	0,20	ns
		obl-	obl-	130	7	5,4	542	346	63,8	160	46,2	186	53,8	1,80	ns
	interespécies	sp1-	obl-	251	2	0,8	20	13	65,0	0	0,0	13	100	15,1	*
		obl-	sp1-	300	8	2,7	239	154	64,4	61	39,6	93	60,4	6,24	*
Infectados vs curados	intra-espécies	sp1+	sp1-	115	26	22,6	195	124	63,5	79	63,7	45	36,3	8,78	*
		sp1-	sp1+	98	7	7,1	50	21	42,0	10	47,7	11	53,3	0,0	ns
		obl+	obl-	300	32	10,7	138	116	84,1	66	56,9	50	43,1	1,94	ns
		obl-	obl+	300	13	4,3	284	185	65,1	93	50,3	92	49,7	0,0	ns
	interespécies	sp1+	obl-	120	0	0,0	40	17	42,5	0	0,0	17	100	15,1	*
		sp1-	obl+	90	1	1,1	5	1	25,0	0	0,0	1		-	-
		obl+	sp1-	265	66	24,9	368	176	47,8	73	41,5	103	58,5	4,77	*
		obl-	sp1+	110	9	8,2	74	49	66,2	19	38,8	30	61,2	2,04	ns

(a) sp1 , *A*. sp.1; obl, *A. obliqua;* +, infectado; -, tratado

36

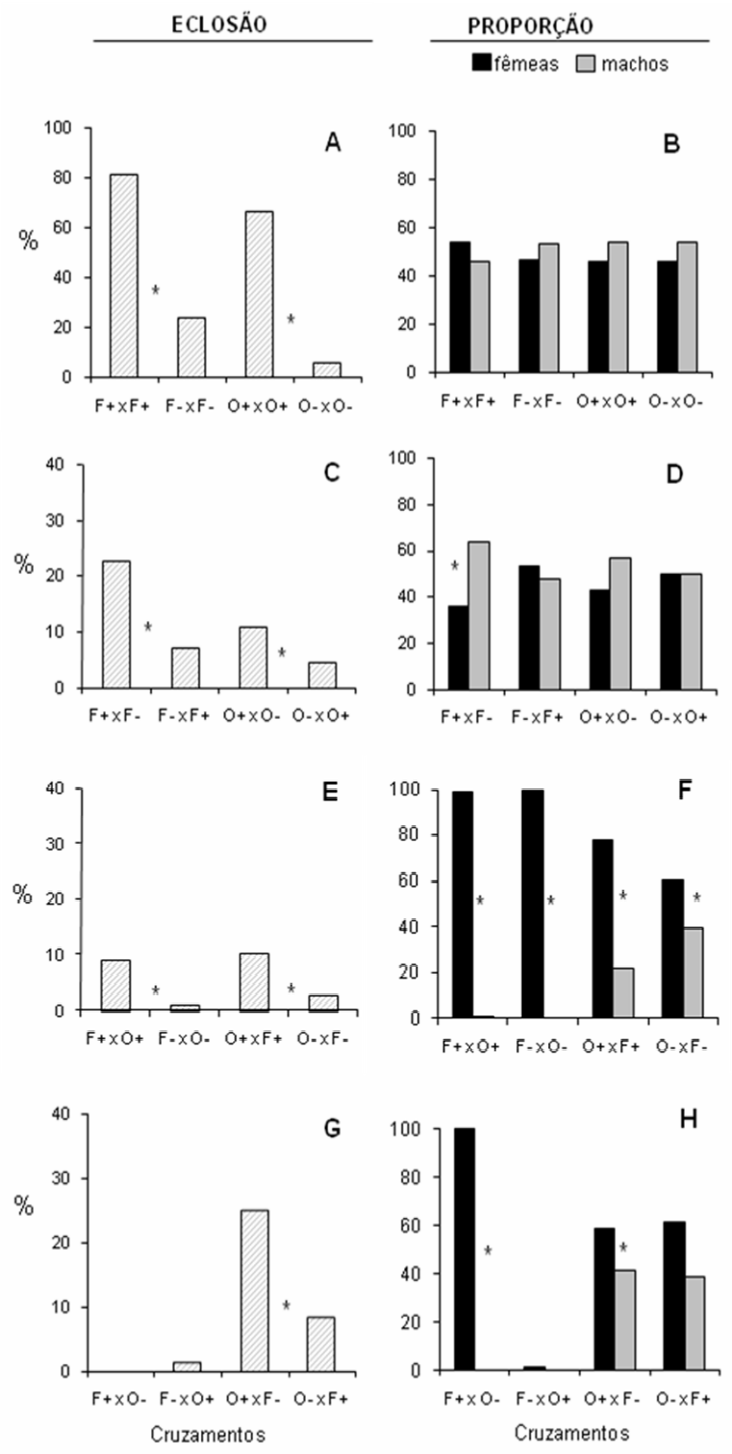

Figura 6. Taxas de eclosão de larvas e proporção sexual entre os adultos em progênies de cruzamentos de *A*. sp.1 e *A. obliqua*. Na coluna da esquerda estão os dados da eclosão e à direita, os da proporção sexual. (A,B) cruzamentos intra-específicos com indivíduos infectados (+) ou curados (-); (C,D) cruzamentos intra-específicos entre infectados e curados; (E,F) cruzamentos interespecíficos com indivíduos infectados ou curados; (G,H) cruzamentos interespecíficos entre infectados e curados. Na indicação dos cruzamentos (abcissas), o primeiro símbolo representa as fêmeas envolvidas e o segundo, os machos, p.ex., F+ x O-, indica o cruzamento entre fêmeas sp1 (F, *fraterculus*) infectada com machos de *obliqua* curada. O símbolo * indica as diferenças significativas entre cruzamentos (dados da Tabela V).

um deles, (fêmea sp1+ x macho sp1-), onde os machos foram mais numerosos que as fêmeas (Tabela IV, Figura 6D).

Cruzamentos interespecíficos com indivíduos infectados e curados

Como demonstram a Tabela IV e a Figura 6E, em cruzamentos inter-específicos entre fêmeas sp1+ com machos obl+ e no cruzamento recíproco, as taxas de eclosão foram muito mais baixas que nos cruzamentos intra-específicos das linhagens parentais. Essas taxas foram ainda menores nos cruzamentos entre fêmeas sp1- com machos obl- e no cruzamento recíproco. Em todos esses cruzamentos interespecíficos, foram observados desvios significativos na proporção sexual: quando as fêmeas foram de sp1+ ou sp.1-, as progênies eram constituídas quase que exclusivamente de fêmeas; entretanto, quando as fêmeas eram de obl+ ou obl-, ocorreram desvios significativos do 1:1, mas além de fêmeas, machos também foram produzidos nessas progênies (Tabela IV e Figura 6F).

Na série seguinte, foram feitos cruzamentos interespecíficos entre indivíduos infectados e curados. Como mostram a Figura 6G e os testes da Tabela V, quando as fêmeas parentais eram de sp1 (infectada ou não) e os machos de *obliqua*, a eclosão foi tão baixa nessas amostras de ovos que análises não puderam ser feitas. No entanto, no cruzamento de fêmea sp1+ com macho obl-, adultos foram obtidos e consistiam exclusivamente de fêmeas. Já no cruzamento recíproco (fêmea sp1- x macho obl+), apenas uma fêmea foi obtida (Tabela IV e Figura 6H). Ao contrário, quando as fêmeas foram de *obliqua* e os machos de sp1, as progênies foram de tamanho similar às de outros cruzamentos envolvendo fêmeas de *A. obliqua*. Nesses cruzamentos, quando o macho parental era infectado (obl- x sp1+) a taxa de eclosão foi significativamente mais baixa (Tabela V e Figura 6G) que no cruzamento recíproco (obl+ x sp1-). Na progênie adulta de ambos os cruzamentos, houve maior número de fêmeas que de machos, mas o desvio estatisticamente significativo da proporção esperada (1:1) somente foi observado para o cruzamento entre fêmea obl+ x macho sp1- (Tabela IV, Figura 6).

Tabela V. Comparações entre as taxas de eclosão[a] dos diferentes cruzamentos envolvendo indivíduos infectados(+) e curados (-) de *A. obliqua* (O) e *A*. sp.1 (F)

Comparações	χ^2	P
F+ x F+ vs F- x F-	10.98	0.01*
O+ x O+ vs O- x O-	63.85	<0.01**
F+ x O+ vs O+ x F+	0.10	0.87 ns
F- x O- vs O- x F-	0.16	0.197 ns
F+ x F- vs F- x F+	6.20	0.013*
O+ x O- vs O- x O+	6.65	0.01*
F+ x O+ vs F- x O-	6.79	<0.01**
O+ x F+ vs O- x F-	10.86	<0.01**
O+ x F- vs O- x F+	8.78	<0.01**

(a) dados na Tabela IV

(χ^2) Tabela de contingência 2x2 com correção de Yates

V. Discussão

Nas últimas décadas enorme ênfase tem sido dada ao estudo da bactéria *Wolbachia* em razão dos efeitos que ela causa no sitema reprodutivo de seus hospedeiros (Werren, 1997, 1998).

Nas moscas-das-frutas da família Tephritidae, a presença da *Wolbachia* foi descrita em numerosas espécies (Werren *et al.* 1995; Selivon *et al.*, 2002; Croscato, 2006; Mascarenhas, 2007), mas não existia, até o momento, nenhum estudo abordando os possíveis efeitos dessa bactéria nos seus hospedeiros.

As análises por PCR e seqüenciamento, demonstrando que as linhagens de laboratório das duas espécies de *Anastrepha*, *A. obliqua* e *A.* sp.1, estavam infectadas pela *Wolbachia*, ampliam os dados sobre a infecção nessas espécies que foram obtidos pela análise de amostras de populações naturais (Croscato, 2006; Mascarenhas, 2007). Embora o seqüenciamento do gene *wsp* de *A.* sp1 e de *A. obliqua* tenha mostrado que essas seqüências têm alta similaridade, inclusive com a seqüência wAu de *Drosophila simulans* (Charlat *et al*., 2004), é necessário lembrar que as linhagens presentes nas duas espécies podem diferir em outras características genéticas. Por essa razão, atualmente a identificação precisa das linhagens dessa bactéria tem sido feita pelo seqüenciamento conjunto de outros genes (Baldo & Werren, 2007). Este fato, entretanto, não interfere com as propostas do presente trabalho que previa a comparação e cruzamentos de linhagens infectadas com linhagens isentas (curadas) de *Wolbachia*, para testar os efeitos nos seus hospedeiros, em outras palavras, procurar evidências de IC, mediada por *Wolbachia*, em espécies de *Anastrepha*.

A análise citológica dos embriões mostrou que nas duas espécies de *Anastrepha* aqui estudadas, a maior concentração da *Wolbachia* no pólo posterior dos embriões é similar ao descrito em *A.* sp.2 *aff. fraterculus* (Selivon *et al.*, 2002) e também, em embriões de outros insetos, p.ex., *Drosophila* (Hadfield & Axton, 1999), nas vespas *Trichogramma* (Stouthamer & Werren, 1993) e *Nasonia* (Breeuwer & Werren, 1993) e no sciarídeo *Sciara ocellaris* (Gutzeit *et al*., 1985; Ribeiro & Perondini, 1991). Segundo alguns autores (Bourtzis *et al.*, 2003), a localização nessa região do embrião favoreceria a

transmissão vertical dessa bactéria, pois elas são incorporadas nas células polares tão logo estas se formam, como mostrado, p.ex., em *Anastrepha* sp.2 *aff. fraterculus* (Selivon *et al.*, 2002).

Os dados também indicam não haver diferenças marcantes na densidade de bactérias entre os embriões de *A. obliqua* e de *A*. sp1. Alguns autores presumem que existem mecanismos que de alguma forma auto-regulam a densidade das bactérias desde que elas são transmitidas verticalmente e seriam selecionadas por reduzir efeitos que confeririam valor adaptativo negativo às fêmeas nas quais elas ocorrem (Turelli, 1994; Werren & O'Neill, 1997). Assim, as bactérias regulariam a taxa de replicação para minimizar efeitos negativos nos hospedeiros, mas ainda manteriam densidade populacional suficiente para protegê-las contra a IC. Em *Drosophila simulans*, uma linhagem que aparentemente perdeu essa auto-regularão, apresentou degeneração neural e a morte precoce dos adultos. Se a auto-regularão da densidade de bactérias é correta, então o ponto de equilíbrio dependeria do genótipo do hospedeiro (Bourtzis *et al.*, 2003). A aparente diferença na densidade de bactérias em *A*. sp.1 e *A*. *obliqua* pode estar relacionada a um efeito dessa natureza. Esse é um aspecto a ser explorado futuramente, incluindo a análise mais detalhada da densidade populacional em embriões híbridos.

Embora não seja possível afirmar, pelo método de coloração com o fluorocromo DAPI, que as bactérias visíveis nas preparações citológicas sejam *Wolbachia*, há fortes indícios de que elas sejam predominantes nos embriões, pois sua presença foi detectada por PCR em outras amostras de embriões de *A*. sp.1 (Croscato, 2006) e também, em embriões de *A*. sp.2 (Selivon *et al.*, 2002). É possível, entretanto, que outras bactérias não identificadas estejam presentes nos ovos de *Anastrepha*, como ocorre em numerosas espécies de insetos. Postula-se que outros tipos de bactérias associadas a *Wolbachia* possam também causar distorções em aspectos reprodutivos dos hospedeiros. Por exemplo, bactérias CFB (Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroids), CLO (Cytophaga-like-organisms) estão associadas com fenômenos de feminização, determinação do sexo e partenogênese. Entretanto, as informações sobre esses grupos de bactérias são mais escassos do que para *Wolbachia* (rev. Weeks & Breeuwer, 2003).

Para a realização dos experimentos era necessária o estabelecimento de colônias das duas espécies de moscas-das-frutas isentas de *Wolbachia*. Deste modo, e como não foram encontradas populações naturais não-infectadas (Coscrato, 2006; Mascarenhas, 2007), foi necessário eliminar-se as bactérias das colônias infectadas do laboratório. Para tanto, dois métodos descritos na literatura foram testados: tratamento com o antibiótico tetraciclina (Yen & Barr, 1974; Breeuwer & Werren, 1993; Werren, 1997) ou pelo tratamento térmico dos indivíduos infectados (Werren, 1997; Bourtzis & O´Neill, 1998). Os resultados demonstram que as bactérias foram mais eficientemente eliminadas pelo tratamento térmico das pupas do que pelo tratamento com tetraciclina. Não se sabe a que se deve esta diferença, pois em outras espécies de insetos ambos os tratamentos são eficazes para a eliminação da *Wolbachia*.

A obtenção de adultos de ambos os sexos, livres de *Wolbachia* (curadas) através do tratamento térmico das pupas foi viável, mas com aumento na mortalidade das pupas. Essa queda nas taxas de emergência, observadas em relação à populações infectadas, não tem grandes implicações, a não ser para o estabelecimento das colônias com indivíduos curados. Entretanto, a emergência foi suficiente (31,2% em *A. obliqua* e 52,9% em *A.* sp1), para o estabelecimento de colônias isentas de *Wolbachia* e foi, a partir dessas populações iniciadas pelos indivíduos curados, que os os experimentos para testar os efeitos da *Wolbachia* nos seus hospedeiros foram realizados.

A literatura mostra que o tratamento com tetraciclina é eficiente em vários casos, por exemplo, no estudo de IC em *Drosophila simulans*, o antibiótico foi adicionado ao meio de cultura numa concentração final de 0,05%, tendo sido obtida com sucesso a linhagem curada. No presente trabalho, o tratamento mesmo com concentração mais alta (1%) não apresentou bom rendimento. A supressão de IC em linhagens de hospedeiros tratados por calor já era conhecida (Wright & Wang, 1980) ainda que as razões para esse efeito não fossem conhecidas. Hoffmann *et al.* (1986) aplicando temperatura de 30 - 32°C observaram a supressão da IC em *D. simulans* e postularam que microrganismos deveriam estar envolvidos. O presente trabalho corroborou que o tratamento em alta temperatura elimina as *Wolbachia* associadas aos indivíduos tratados, ainda que causem maior mortalidade, seja pela própria eliminação do simbionte, ou por outro tipo de perturbação exercida durante a

metamorfose. Uma redução na taxa de emergência de adultos de A. *obliqua* a partir de pupas submetidas ao calor, também foi observada por Pires (2005).

A eliminação das *Wolbachia* causa, de modo geral, uma queda na taxa de eclosão nas progênies dos diferentes cruzamentos (Figura A, C, E, G). Em outros insetos demonstrou-se que a eliminação das *Wolbachia* causa uma redução no desempenho reprodutivo das fêmeas sugerindo um efeito da infecção no valor adaptativo do hospedeiro (Dedeine *et al.*, 2003).

Os resultados dos cruzamentos intra-específicos (Fig. 6C) nos quais verificou-se redução na taxa de eclosão quando os machos infectados foram cruzados com fêmeas curadas, mostraram claramente a existência de IC associada à *Wolbachia*. Esses dados estão de acordo com o modelo de modificação/ recuperação - mod/rec - (Werren, 1997), ou seja, os gametas de machos infectados que teriam sofrido a modificação não são compatíveis com ovos de fêmeas que não possua o sistema de recuperação. Os resultados da Figura 6A também são compatíveis, onde machos e fêmeas infectados apresentariam os fatores mod/rec e os cruzamentos entre indivíduos curados não teriam incompatibilidade por não terem nenhum fator de mod/rec.

Nos cruzamentos interespecíficos entre indivíduos infectados e indivíduos curados, as taxas de eclosão foram baixas nos indivíduos infectados e ainda menores nos cruzamentos de indivíduos curados, possivelmente pelos motivos já comentados. Uma vez que nesses cruzamentos não se esperaria IC, a baixa eclosão possivelmente é devida às diferenças genéticas entre os hospedeiros.

Em cruzamentos interespecíficos entre indivíduos infectados com curados (Figura 6G), nota-se taxas de eclosão extremamente baixas quando as fêmeas são de sp1, mas taxas maiores, embora assimétricas nos cruzamentos recíprocos, quando as fêmeas eram de *obliqua*, o que sugere, segundo o modelo mod/rec, a existência de IC entre as espécies.

É relevante notar o resultado do cruzamento de fêmeas obl+ x machos sp1+, mostrado na Figura 6E, quando comparado ao cruzamento de fêmeas obl+ x machos sp1- (Fig. 6G). Pelo modelo do mod/rec, os resultados desses dois cruzamentos deveriam ser similares. Entretanto, a taxa de eclosão do primeiro (obl+ x sp1+) é, praticamente, metade daquela observada no outro. Estes resultados poderiam ser explicados se as linhagens de *Wolbachia*

existentes nas colônias de *obliqua* e de sp.1 não fossem tão similares, ou então, se apresentarem diferenças em outras regiões do genoma, ou ainda, se assumirmos a presença de outras bactérias causadoras de IC.

A existência de IC, congruente com o modelo de mod/rec, foi descrita em vários insetos (revisões Werren, 1997; Dobson, 2003; Bourtzis *et al.*, 2003) e também, em outros gêneros de moscas-das-frutas. Em populações de *Rhagoletis cerasi* de diferentes regiões da Europa, foram encontradas duas diferentes linhagens de *Wolbachia* que explicariam os casos de IC descritos anteriormente, mas sem que a etiologia fosse elucidada (Riegler & Stauffer, 2002). IC foi também descrita em *Ceratitis capitata*, que foi infectada artificialmente em laboratório com *Wolbachia* de *Rhagoletis cerasi*, visando o desenvolvimento de método de controle populacional alternativo ao TIE (Zabalou *et al.*, 2004).

Já eram conhecidos resultados da literatura (Santos *et al*., 2001) mostrando que nos cruzamentos recíprocos entre *obliqua* e sp.1, ocorrem desvios na proporção sexual entre os adultos. Esses fatos foram corroborados no presente trabalho quando as linhagens infectadas foram cruzadas entre si, como veremos a seguir.

A proporção sexual manteve-se em 1:1 nas progênies adultas dos cruzamentos intra-específicos, independentemente dos parentais estarem ou não infectados pela *Wolbachia* (Figura 6B, 6D). A exceção foi o cruzamento de fêmeas sp1+ x sp1- (Figura 6D), no qual houve uma redução no número de fêmeas. Este é um resultado de difícil interpretação uma vez que não seria esperado, considerando-se a ausência de *Wolbachia* nos machos parentais. É muito possível que tenha ocorrido um problema amostral ou experimental nesses cruzamentos.

Os resultados obtidos na proporção sexual das progênies dos cruzamentos interespecíficos (Figura 6F) estão de acordo com os resultados obtidos anteriormente por Santos *et al.* (2001). Quando a fêmea parental é sp.1 há praticamente 100% de fêmeas na progênie, mas quando a fêmea é *obliqua*, recupera-se também um certo número de machos. Esses autores interpretaram os resultados como casos da regra de Haldane e/ou efeitos citoplasmáticos. Os dados obtidos no presente trabalho mostram que os resultados desse tipo de cruzamento são pouco alterados com a presença ou ausência de *Wolbachia*

nos indivíduos parentais (Figura 6F). Entretanto, o cruzamento de fêmeas obl+ x machos sp1- (Figura 6H) quando comparado ao cruzamento de fêmeas de obl+ x machos sp1+ (Figura 6F), mostra que quando os machos parentais estão curados, há uma recuperação maior de machos na progênie. Isso sugere que deve existir uma interação entre a *Wolbachia* e a incompatibilidade existente entre os genomas das espécies hospedeiras. Interrelações dessa natureza já foram observadas em *Drosophila* e *Nasonia* (Bourtzis *et al*., 2003). Pela análise dos resultados das Figura 6B, D, F, H, é possível verificar se há ou não morte diferencial entre os sexos ao comparar com as taxas de eclosão das Figura 6 A, C, E, G.

O fato da *Wolbachia*, pelo mecanismo de IC agir como um fator de especiação tem gerado muita controvérsia. O conceito básico é que IC, por prevenir ou severamente reduzir o fluxo gênico entre populações favoreceria a divergência entre espécies. Existem dois modos através dos quais a *Wolbachia* poderia estar diretamente envolvida em processos de especiação. Primeiramente, a IC bidirecional estaria entre as causas primárias de isolamento reprodutivo pois promoveria um isolamento "instantâneo", propiciando, posteriormente, o acúmulo de divergência genética nos hospedeiros. Em segundo lugar, a IC unidirecional contribuiria para o isolamento entre populações que estivessem em processo de divergência. Assim, a IC unidirecional não seria uma das causas primárias do isolamento reprodutivo, mas seria um fator essencial na manutenção do isolamento entre espécies incipientes. Na aquisição de diferentes linhagens de *Wolbachia* seria particularmente importante o fato de ocorrer transferência horizontal dessas bactérias, vindas de um outro organismo associado (Werren, 1998; Telschow & Werren, 2005). Existem evidências que tal processo ocorra entre espécies *Anastrepha*, mediado por himenópteros parasitóides associados (Mascarenhas, 2007). As alterações em aspectos reprodutivos das espécies de *Anastrepha* aqui estudadas, associadas com *Wolbachia*, não permitem descartar a possibilidade de que essa bactéria possa, eventualmente, estar envolvida nos processos de divergência de espécies nesse grupo de insetos.

Em conclusão, este trabalho apresenta a primeira demonstração de IC em *Anastrepha*. As implicações desse fenômeno para o entendimento da divergência entre espécies desse grupo, bem como possíveis aplicações em

aspectos práticos no manejo desses insetos-praga, deverão ser abordados no futuro.

V. CONCLUSÕES

- As colônias de laboratório de *A*. sp1 *aff. fraterculus* e *A. obliqua* estão infectadas pela bactéria endossimbionte *Wolbachia*.
- Nos embriões das duas espécies, as bactérias distribuem-se em gradiente decrescente do pólo posterior para o pólo anterior.
- O tratamento térmico a 30°C é mais eficiente que o tratamento com tetraciclina para eliminar as bactérias de seus hospedeiros.
- O tratamento eleva a taxa de mortalidade no estágio de pupas porém afeta igualmente machos e fêmeas.
- Nas duas espécies, a eliminação das *Wolbachia* causa um decréscimo nas taxas de eclosão em relação à eclosão das linhagens infectadas, mas nenhuma alteração na proporção sexual entre os adultos.
- A *Wolbachia* está associada a ocorrência de incompatibilidade citoplasmática (IC) tanto em *A. obliqua* quanto em *A*. sp.1.
- Existe IC associada a *Wolbachia* nas progênies obtidas de cruzamentos entre fêmeas de *obliqua* com machos sp.1.
- Há uma redução significativa na taxa de eclosão das larvas da progênie híbrida obtida em cruzamentos entre *A. obliqua* e *A*. sp.1. Tal redução é ainda mais drástica quando a *Wolbachia* é eliminada.
- A eliminação das *Wolbachia* não interferem na proporção sexual das progênies das duas espécies de *Anastrepha*,
- A proporção sexual da progênie obtida a partir dos cruzamentos entre *A. obliqua* e *A.* sp.1 infectados, apresentou desvios significativos de acordo com a regra de Haldane, corroborando dados da literatura.
- A eliminação da *Wolbachia* altera a proporção sexual em cruzamentos interespecíficos de indivíduos infectados com curados.

VI. RESUMO

Wolbachia é um gênero de bactérias endossimbiontes que são verticalmente transmitidas pelas fêmeas aos seus descendentes, embora transmissão entre táxons distintos também ocorra com certa freqüência. Entre os efeitos que essa bactéria causa nos sistemas de reprodutivos de seus hospedeiros destaca-se a incompatibilidade citoplasmática (IC). *Wolbachia* foi descrita em numerosas espécies de artrópodos, especialmente os insetos. Dentre os insetos, essa bactéria foi descrita em diversos gêneros das moscas-das-frutas da familia Tephritidae, tendo sido demonstrada a IC em *Rhagoletis cerasi* e *Ceratitis capitata*. Recentemente, essas bactérias foram identificadas nas moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha.* No presente trabalho, procurou-se demonstrar se a *Wolbachia* estaria relacionada a IC entre *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus* e *Anastrepha obliqua*. A amplificação e o seqüenciamento do gene *wsp* revelou que as populações das duas espécies, mantidas no laboratório, estavam infectadas por *Wolbachia*. A presença da bactéria foi, também, demonstrada citologicamente em embriões corados pelo DAPI, tendo-se, além disso, observado que elas se distribuem nos embriões em gradiente decrescente do pólo posterior para o anterior. Para testar a hipótese de que a bactéria é a causa da IC, foram estabelecidas populações das duas espécies onde a *Wolbachia* (e possivelmente outras bactérias não identificadas) foram eliminadas por tratamento térmico (30°C) aplicado às pupas. As taxas de eclosão de larvas nas progênies de cruzamentos entre indivíduos curados, foram menores que a eclosão nos cruzamentos entre indivíduos infectados, mas o tratamento não alterou a proporção sexual dos adultos. Cruzamentos intra-específicos entre indivíduos infectados e curados, produziu assimetria nas progênies dos cruzamentos recíprocos, ou seja, quando os fêmeas eram curadas e os machos infectados a taxa de eclosão foi significativamente menor que nos cruzamentos recíprocos demonstrando, assim, a existência de IC unidirecional nos cruzamentos dessas duas espécies de *Anastrepha*. Nesses cruzamentos, a proporção sexual das progênies adultas não divergiu significativamente do 1:1 esperado. Nas progênies híbridas de cruzamentos interespecíficos entre indivíduos infectados, observou-se um decréscimo

significativo nas taxas de eclosão e alteração na proporção sexual entre os adultos, de acordo com a regra de Haldane. Quando as fêmeas eram de *A*. sp.1, as progênies eram constituídas apenas por fêmeas e quando eram de *A. obliqua,* machos também foram produzidos, mas em frequências menores que o esperado. Resultados similares foram obtidos quando indivíduos curados foram cruzados entre si. Cruzamentos interespecíficos de indivíduos infectados cruzados com indivíduos curados, produziram progênies com taxas de eclosão muito reduzidas e menores quando as fêmeas eram de *A*. sp.1 (infectadas ou curadas), do que nos cruzamentos onde as fêmeas eram de *A. obliqua* (infectadas ou não). Nestes últimos, quando a fêmea era infectada e os machos curados, a taxa de eclosão foi maior que no cruzamento recíproco, demonstrando a presença de IC entre as duas espécies. A proporção sexual também foi alterada nesses cruzamentos, segundo a regra de Haldane. Os resultados do presente trabalho demonstram, pela primeira vez, que a incompatibilidade citoplasmática mediada pela *Wolbachia,* ocorre nas duas espécies de *Anastrepha* e sugerem que deve existir uma interação entre a bactéria e os genomas das espécies hospedeiras.

VII. ABSTRACT

The endosymbiont bacteria *Wolbachia* are vertically transmitted by the females to its progenies, although horizontal transmission between distinct taxa is also known. One of the most relevant effects caused by these bacteria in the reproductive behavior of its hosts is the cytoplasmic incompatibility (CI). *Wolbachia* was described in several groups of arthropods, in the insects including several genera of the tefritid fruit flies. Wolbachia-induced CI was reported in *Rhagoletis cerasi* and *Ceratitis capitata.* Recently, occurrence of these bacteria was described in several species of genus *Anastrepha.* Search for possible *Wolbachia*-induced CI in crosses of *Anastrepha obliqua* and *A*. sp.1 *aff. fraterculus* was the aim of the present study. Amplification and sequencing of the gene *wsp* of *Wolbachia* revealed that laboratory colonies of both species were infected with this bacteria. Cytological analysis of embryos stained with DAPI showed a multitude of bacteria distributed in decreasing gradients from the posterior to the anterior pole of the embryos. The hypothesis that there is CI between the two host species was tested using infected and cured individuals. The bacteria were removed by treating the pupae at the temperature of 30° C. Rate of egg hatch in progenies recovered from crosses of cured flies were lower than egg hatch in crosses of the infected strains, but no sex-ratio deviation from the expected 1:1 was observed. Intra-specific crosses between infected and cured individuals resulted in asymmetries in the progenies of reciprocal crosses. The egg hatch in crosses of cured *obliqua* females to infected sp.1 males was lower than in the reciprocal crosses, clearly indicating the presence of *Wolbachia*-induced CI in *Anastrepha*. In these crosses, sex-ratio among the adults does not deviate from the 1:1 ratio. In the hybrid progenies of inter-specific crosses, it was observed a decrease in the egg hatch rate, and deviation from 1:1 in the adult sex-ratio according to the Haldane's rule. From crosses of sp.1 females to *obliqua* males, only females were recovered while in crosses of *obliqua* females to sp.1 males, males were also produced but in lower frequencies than expected. Similar results were obtained when cured individuals were crossed. Very low egg hatch rates were observed in inter-specific crosses of infected to cured individuals, when sp.1 females (infected or

cured) were used. In crosses of *obliqua* females (infected or cured), higher egg hatch rate was observed. Egg hatch was larger in crosses of infected female to cured males than in the reciprocal crosses, indicating a *Wolbachia*-induced IC between the two species of *Anastrepha*. The sex-ratios were also according to the Haldane's rule. This is the first report of *Wolbachia*-induced CI in *Anastrepha*. The existence of a possible interaction between the bacteria and the genomes of the host species is also suggested.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aluja,M. 1994. Bionomics and Management of *Anastrepha*. Annual Review. of Entomology. 39: 155-178.

Baldo, L.; Lo, N. & Werren, J.H. 2005. Mosaic Nature of the *Wolbachia* Surface Protein. Journal of Bacteriology. 185 (15): 5406–5418.

Baldo, L. & Werren, J.H. 2007. Revisiting *Wolbachia* Supergroup Typing Based on *wsp*: Spurious Lineages and Discordance with MLST. Current Microbiology 55: 81–87.

Barr, N.B.; Cui, L.; McPheron, B.A. 2005. Molecular Systematics of Nuclear Gene *period* in genus *Anastrepha* (Tephritidae). Annals of the Entomological Society of America: 98(2): 173-180.

Beard, C.B.; O'Neill, S.L.; Tesh, R.B.; Richard, F.F. & Aksoy, S. 1993. Modification of arthropod vector competence via symbiotic bacteria. Parasitology Today, 9: 179-183.

Bourtzis, K.; Braig, H. R. & Karr, T. L. 2003. Cytoplasmic Incompatibility. p. 217-246. Em: "Insect Symbiosis". Bourtzis, K. & Miller, T. A. (ed.). CRC Press. Boca Raton, Florida.

Bourtzis, K. & O'Neill, S.L., 1998. *Wolbachia* infections and arthropod reproduction. Bioscience 48, 287–293.

Breeuwer, J.A.J. 1997. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the spider mites *Tetranychus urticae* and T. *Turkestani*. Heredity 79: 41-47.

Breeuwer, J.A.J. & Werren, J.H. 1993. Cytoplasmic Incompatibility and Bacterial Density in *Nasonia vitripennis*. Genetics 135: 565-574.

Charlat, S.; Ballard, J.W.O. & Merçot, H. 2004. What maintains noncytoplasmic incompatibility inducing *Wolbachia* in their hosts: a case study from a natural Drosophila yakuba population. Journal of Evolutionary Biology 17: 322-330.

Clark, M.E.; Bailey-Jourdain, C.; Ferree, P.M.; England, S. J.; Sullivan, W.; Windsor, D. M. & Werren, J. H. 2008. *Wolbachia* modification of sperm does not always require residence within developing sperm. Heredity 101: 420–428.

Coscrato, V.E. 2006. Detecção e filogenia da bactéria *Wolbachia* em moscas-das-frutas *Ceratitis capitata* e em espécies de *Anastrepha* (Diptera:

Tephritidae). Tese de doutorado. Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, SP.

Dedeine, F.; Bandi, C.; Boulétreau, M & Kramer, L.H.. 2003. Insights into *Wolbachia* Obligatory Symbiosis. p. 267-282. Em: "Insect Symbiosis". Bourtzis, K. & Miller, T. A. (ed.). CRC Press. Boca Raton, Florida.

Dedeine, F.; Vavre, F.; Fleury, F.; Loppin, B.; Hochberg, M.E. & Boulétreau, M. 2001. Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. Proceedings of National Academy of Science 98: 6247-6252.

Dobson, S. L. 2003. *Wolbachia pipientis*: Impotent by Association. p. 199-216. Em: "Insect Symbiosis". Bourtzis, K. & Miller, T. A. (ed.). CRC Press. Boca Raton, Florida.

Dobzhansky, T. 1937. Genetics and the origin of species. Columbia University Press, New York.

Frydman, H.M., Li, J.M., Robson, D.N. & Wieschaus, E. 2006. Somatic stem cell niche tropism in *Wolbachia*. Nature 441: 509–512.

Gutzeit, H.O.; Zissler, D. & Perondini, A.L.P. 1985. Intracellular translocation of symbiotic bacteroids during late oogenesis and early embryogenesis of *Bradysia tritici* (syn. *Sciara ocellaris*) (Diptera; Sciaridae). Differentiation 29: 223-229.

Hadfield, S.J. & Axton, J.M. 1999. Germ cells colonized by endosymbiotic bacteria. Nature 402: 482.

Hariri, A.R., Werren, J.H. & Wilkinson, G.S. 1998. Distribution and reproductive efects of *Wolbachia* in stalk-eyed flies (Diptera: Diopsidae). Heredity 81, 254-260.

Hilgenboecker, K.; Hammerstein, P.; Schlattmann, P.; Telschow, A. & Werren, J.H. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? - a statistical analysis of current data. FEMS Microbiology Letters 281: 215–220.

Hoffmann, A.A.; Hercus, M. & Dagher, H. 1998. Population Dynamics of the *Wolbachia* Infection Causing Cytoplasmic Incompatibility in *Drosophila melanogaster.* Genetics 148:221–231.

Hoffmann, A.A.; Turelli, M.; Simmons, G.M. 1986. Unidirectional Incompatibility between populations of *Drosophila simulans*. Evolution 40: 692-701.

Hurst, G.D.D.; Jiggins, F.M.; Schulenburg, H.G.J.; Bertrand, D.; West, S.A.; Goriacheva, I.I.; Zakharov, I.A.; Werren, J.H.; Stouthamer, R. & Majerus, M.E.N. 1999. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. Proceedings of Royal Society of London B 266: 735-740.

Jamnongluk, W., Kittayapong, P.; Baimai, V. & O'Neill, S.L. 2002. *Wolbachia* infections of tephritid fruit flies: molecular evidence for five distinct strains in a single host species. Current Microbiology 45:255-260.

Jeyaprakash, A. & Hoy, M.A. 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. Insect Molecular Biology 9: 393-405.

Jigging, F.M.; Bentley, M., E., N.; MAJERUS & G. D. D. HURST, 2001 How many species are infected with *Wolbachia*? Cryptic sex ratio distorters revealed to be common by intensive sampling. Proceedings of Royal Society of London B 268: 1123-1126.

Jowett, T. 1986. Preparation of nucleic acids. Em: Drosophila: A Practical Approach. D.B. Roberts, D.B. (ed). Oxford: IRL Press Limited.

Keller, G.P.; Windsor, D.M.; Saucedo, J.M. & Werren, J.H. 2004. Reproductive effects and geographical distribution of two *Wolbachia* strains infecting the neotropical beetle, *Chelymorpha alternans* Boh. (Chrysomelidae, Cassidinae). Molecular Ecology 13: 2405-2420.

Kittayapong, P.; Milne, J.R.; Tigvattananont, S. & Baimai, V. 2000. Distribution of the reproduction-midifying bacteria, *Wolbachia*, in natural populations of tephritid fruit flies in Thailand. Science Asia 26: 93-103.

Koivisto, R.K.K. & Braig, H.R. 2003. Microorganisms and parthenogenesis. Biological Journal of Linnean Society 79: 43-58.

Kondo, N.; Nikoh, N.; Ijichi. N.; Shimada, M. & Fukatsu, T. 2002. Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. Proceedings of National Academy of Science 99: 14280–14285.

Kose, H. & Karr, T.L. 1995. Organization of *Wolbachia pipientis* in the Drosophila fertilized egg and embryo revealed by an anti-Wolbachia monoclonal antibody. Mechanisms of Development 51: 275-288.

Koukou, K.; Pavlikaki, H.; Kilias, G.; Werren, J.H.; Bourtzis, K. & Alahiotis, S.N. 2006. Influence of antibiotic treatment and *Wolbachia* curing on sexual

isolation among *Drosophila melanogaster* cage populations. Evolution, 60: 87-96.

Lavagnolli, T.; Mascarenhas, R.; Rocha, L.; Perondini, A.L.P. & Selivon, D. 2005. Detecção de *Wolbachia* em amostras de insetos da região Neotropical. CD-ROM do 51º. Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, SP, Brasil.

Lo, N.; Casiraghi, M.; Salati,E.; Bazzocchi,C. & Bandi, C. 2002. How Many *Wolbachia* Supergroups Exist? Molecular Biology and Evolution 19(3):341–346.

Lo, N.; Paraskevopoulos, C.; K. Bourtzis, K.; O'Neill, S.L.; Werren, J.H.; Bordenstein, S.R. & Bandi, C. 2007. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 654-657.

Malavasi, A.; Zucchi, R.A. & Sugayama, R. L. 2000. Biogegrafia. p.93-98 Em: "Moscas-das-frutas de Importância Econômica no Brasil: Conhecimento Básico e Aplicado". Malavasi, A. & Zucchi, R. A. (ed.). Holos, Ribeirão Preto.

Mascarenhas, R.O. 2007. Endossimbionte *Wolbachia* em moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* (Tephritidae) e em vespas parasitóides (Braconidae) associadas. Dissertação de Mestrado. Depto de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.

McGraw, E.A.; Merritt, D.J., Droller, J., N. & O'Neill, S.L. 2002. *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host. Proceedings of National Academy of Science 99(5): 2918–2923.

Mouton, L.; Henri, H.; Bouletreau, M. & Vavre, F. 2003. Strain-specific regulation of intracellular *Wolbachia* density in multiply infected insects. Molecular Ecology 12: 3459–3465.

Murillo, T. & Jirón, L. F. 1994. Egg morphology of *Anastrepha obliqua* and some comparative aspects with eggs of *Anastrepha fraterculus* (Diptera:Tephritidae). Florida Entomologist 77(3):342-348.

Nikoh, N.; Tanaka, K.; Shibata, F.; Kondo, N.; Hizume, M.; Shimada, M. & Fukatsu, T. 2008. *Wolbachia* genome integrated in an insect chromosome: Evolution and fate of laterally transferred endosymbiont genes. Genome Research. 18: 272-280.

Norrbom, A.L.; Zucchi, R.A.; Hernández-Ortiz, V. 1999. Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based on morphology. P. 299-342. Em: Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior. Aluja, M.; Norrbom, A.L. (eds.) CRC Press, Boca Ratón, Flórida.

O'Neill, S. L.; Giordano,R.; Colbert, A. M. E. & Karr,T. L.; Robertson, H. M. 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmatic incompatibility in insects. Proceedings of National Academy of Science USA 89:2699–2702.

Panaram, K. & Marshall, J. L. 2007. F supergroup *Wolbachia* in bush crickets: what do patterns of sequence variation reveal about this supergroup and horizontal transfer between nematodes and arthropods? Genetica: 130:53–60.

Pires, A. O. 2005. Variações no padrão simétrico de cerdas em diferentes condições de desenvolvimento em *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). Tese de Doutorado. Depto de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.

Prezotto, L.F. 2008. Análise do ITS1 do DNA ribossômico em espécies do complexo *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). Dissertação de Mestrado. Depto de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.

Ribeiro, A.F. & Perondini, A.L.P. 1991. Symbiont bacteroids in eggs and germ cells of *Sciara ocellaris* (Diptera;Sciaridae). Inverterbrate Reproduction and Development. 19: 127-133, 1991.

Riegler, M. & Stauffer, C. 2002. *Wolbachia* infections and superinfections in cytoplasmically incompatible populations of the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). Molecular Ecology 11: 2425-2434.

Rocha, L.S.; Mascarenhas, R.O.; Perondini, A.L.P. & Selivon, D. 2005. Occurrence of *Wolbachia* in brazilian samples of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Neotropical Entomology 34: 1013-1015.

Rocha, L.S.; Selivon, D. 2004. Studies on highly repetitive DNA in cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae), p.415-418. Em: Proc. 6th International Fruit Flies Symposium, 6-10 May 2002,

Stellenbosch, South Africa, Barbes, B. (ed.), Isteg Scientific Publication, Irene, África do Sul.

Rousset, F.; Raymond, M. & Kjellberg, F. 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. Proceedings of Royal Society of London B 250: 91-98.

Salles, L.A.. 2000. Biologia e ciclo de vida de Anastrepha fraterculus (Wied.). p. 81-86. Em: "Moscas-das-frutas de Importância Econômica no Brasil: Conhecimento Básico e Aplicado". Malavasi, A. & Zucchi, R. A. (ed.). Holos, Ribeirão Preto.

Santos, P., Uramoto K.& Matioli, S.R. 2001. Experimental hybridization among *Anastrepha* species (Diptera: Tephritidae): production and morphological characterization of F_1 hybrids. Annals of Entomological Society of America 94:717-725.

Selivon, D. 1996. Estudo sobre a diferenciação populacional em *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Tese de Doutorado. Depto de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.

Selivon, D. & Perondini, A.L. 2000. Morfologia dos ovos de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha*. p. 49-54. Em: "Moscas-das-frutas de Importância Econômica no Brasil: Conhecimento Básico e Aplicado". Malavasi, A. & Zucchi, R. A. (ed.). Holos, Ribeirão Preto.

Selivon, D. & Perondini, A.L.P. 2007. Especies crípticas Del complejo *Anatrepha fraterculus* en Brasil. p.101-118. Em: "Moscas de La Fruta em Latinoamérica (Diptera: Tephritidae): Diversidad, biologia y manejo". Henández-Ortiz (ed). S y G editores, Distrito Federal, México.

Selivon, D.; Perondini, A.L.P. & Morgante, J.S. 1999. Haldane´s rule and other aspects of reproductive isolation observed in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). Genetics and Molecular Biology 22: 507-510.

Selivon, D.; Perondini A.L.P.; Goday, C.; Sánchez, L.; Ruiz, M.F. 2004 Caracterização de regiões heterocromáticas dos cromossomos mitóticos e do DNA ribossômico de espécies de Anastrepha (Diptera: Tephritidae). 50° Congresso Nacional de Genética. Florianópolis (CD do congresso)..

Selivon, D; Vretos, C.; Fontes, L.; Perondini, A.L.P. 2004b. New variant forms in the *Anastrepha fraterculus* complex. p.253-258. Proceedings of. 6th

International Fruit Flies Symposium, 6-10 May, Stellenbosh, South Africa, B. Barne 9ed.), Isteg Scientific Publications, Irene, Africa do Sul.

Selivon, D.; Perondini, A.L.P.; Ribeiro, A.F.; Marino, C.L.; Lima, M.M.A. & Coscrato, V.E. 2002. *Wolbachia* endosymbiont in a species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). Invertebrate Reproduction and Development 42: 121-127.

Selivon, D.; Perondini, A. L. P.; Morgante, J.S. 2005. A genetic-morphological characterization of two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). Annals of the Entomological Society of America: 98(3): 367-381.

Sinkins, S.P.; Braig, H.R. & O´Neill, S.L. 1995. *Wolbachia pipientis*: Bacterial density and unidirectional cytoplasmic incompatibility between infected populations of *Aedes albopictus*. Experimental Parasitology 81: 285-291.

Smith-Caldas, M.R.B.; McPheron, B.A.; Silva, J.G.; Zucchi, R.A. 2001. Phylogenetic relationships among species of the *fraterculus* group (*Anastrepha*: Diptera: Tephritidae) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I. Neotropical Entomology 30: 565-573.

Stone, A. 1942. The fruit flies of the genus *Anastrepha*. U.S. Dep. of Agric., Miscellaneous Publication 439: 1-112.

Sun, X.; Cui, L. & Li, Z. 2007. Diversity and Phylogeny of *Wolbachia* Infecting *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) Populations from China. Environmental Entomology 36(5): 1283-1289.

Telschow, A.; Hammerstein, P. & Werren, J.H. 2005a. The effect of *Wolbachia* versus genetic incompatibilities on reinforcement and speciation. Evolution 59: 1607-1619.

Telschow, A.; Yamamura, Y. & Werren, J.H. 2005b. Bidirectional cytoplasmic incompatibility and the stable coexistence of two *Wolbachia* strains in parapatric host populations. Journal of Theoretical Biology. 235: 265-274.

Tram U. & Sullivan, W., 2002. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. Science 296: 1124-1126.

Turelli, M. 1994. Evolution of incompatibility inducing microbes and their hosts. Evolution 48: 1500-1513.

Turelli, M. 2000. The Causes of Haldane´s Rule. Science 282: 889-891.

Weeks, A.R. & Breeuwer, J. A.J. 2003. A New Bacterium from the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides Phylum That Causes Sex-Ratio Distortion. p. 165-176. Em: “Insect Symbiosis”. Bourtzis, K. & Miller, T. A. (ed.). CRC Press. Boca Raton, Florida.

Werren, J.H. 1997. Biology of Wolbachia. Annu. Rev. Entomol. 42: 587-609.

Werren, J.H. 1998. *Wolbachia* and Speciation. p. 245-260. Em: “Endless forms: species and speciation”, Howard, D.; Berlocher, S. (eds.), Oxford University Press, Oxford.

Werren, J.H; O'Neill, S.L 1997 The evolution of heritable symbionts. . p.1–41 Em: “Influential passengers: Inherited microorganisms and arthropod reproduction”, O'Neill, S.L.; Hoffmann, A.A.; Werren J.H. (ed.). Oxford: Oxford University Press. p.1–41.

Werren, J.H.; Windsor, D. & Guo, L.R. 1995. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. Proc. Royal Soc. London B. 262:197-204.

Werren, J.H. & Windsor, D.M. 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? Proc. R. Soc. Lond. B 267: 1127-1285.

White, I.M.; Elson-Harris, M.M. 1992. Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics. CAB International, Wallinford, UK.

Wieschaus, E. & Nüsslein-Volhard, C. 1986. Looking at embryos. Em: *Drosophila*: a practical approach. IRL Press, Oxford.

Wright, J.D. & Wang, B.-T. 1980. Observation on *Wolbachia* in mosquitoes. J Invertebr Pathol 22: 242–250.

Yen, J.H. & Barr, A.R. 1974. Incompatibility in *Culex pipiens*. p. 97-118. Em : “The Use of Genetics in Insect control. Pal, R. & Whitten, M.J. (eds). Elsevier North-Holland, Amsterdam.

Zabalou, S.; Riegler, M.; Theodorakopoulou, M.; Stauffer, C.; Savakis, C. & Bourtzis. K. 2004. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. Proceedings. National. Academy of Science of USA 101: 15042-15045.

Zhou, W.; Rousset, F. & O´Neill, S. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. Proceedings Royal Society of London B 265: 509-515.

Zucchi, R.A. 2007. Diversidad, Distribución y Hospederos del Género *Anastrepha* em Brasil. Em: Hernándes-Ortiz, V. (Ed.). Moscas de La fruta

em Latinoamérica (Diptera: Tephritidae): diversidade, biologia y manejo. S y G editores, Distrito Federal.

Anexo I. Comparação das seqüências consenso do gene wsp de *A. obliqua* e *A.* sp.1

```
#obl/sp1   ------GAAA CTAGCTACTA CGTTCGTTTG CAATACAACG GTGAATTTTT ACCTCTTTTC ACAAAAGTTG ATGGTATTAC
#AF290891  GATGAAGAAA CTAGCTACTA CGTTCGTTTG CAATACAACG GTGAATTTTT ACCTCTTTTC ACAAAAGTTG ATGGTATTAC

#obl/s     CTATAAGAAA GACAAGAGTG ---------- ----ATTACA GTCCATTA-A AACCATCTTT TATAGCTGGT GGTGGTGCAT
#AF290891  CTATAAGAAA GACAAGAGTG ---------- ----ATTACA GTCCATTA-A AACCATCTTT TATAGCTGGT GGTGGTGCAT

#obl/      TTGGTTACAA AATGGACGAC ATCAGGGTTG ATGTTGAAGG AGTTTATTCA TACCTAAACA AAAATGATGT TAAAGATGTA
#AF290891  TTGGTTACAA AATGGACGAC ATCAGGGTTG ATGTTGAAGG AGTTTATTCA TACCTAAACA AAAATGATGT TAAAGATGTA

#wsp       ACATTTGACC CAGCAAATAC TATTGCAGAC AGTGTAACAG CAATTTCAGG ATTAGTGAAC GTGTATTACG ATATAGCAAT
#AF290891  ACATTTGACC CAGCAAATAC TATTGCAGAC AGTGTAACAG CAATTTCAGG ATTAGTGAAC GTGTATTACG ATATAGCAAT

#obl/sp1   TGAAGATATG CCTATCACTC CATACATTGG TGTTGGTGTT GGTGCAGCGT ATATTAGCAC TCCTTTGGAA CCCGCTGTGA
#AF290891  TGAAGATATG CCTATCACTC CATACATTGG TGTTGGTGTT GGTGCAACGT ATATTAGCAC TCCTTTGGAA CCCGCTGTGA

#obl/sp1   ATGATCAAAA AAGTAAATTT GGTTTTGCTG GTCAAGTAAA AGCTGGTGTT AGTTATGATG TAACTCCAGA AGTCAAACTT
#AF290891  ATGATCAAAA AAGTAAATTT GGTTTTGCTG GTCAAGTAAA AGCTGGTGTT AGTTATGATG TAACTCCAGA AGTCAAACTT

#obl/sp1   TATGCTGGAG CTCGTTATTT CGGTTCTTAT GGTGCTAATT TTGATGG--- -----CAGAT CCTAAAGATT CAACCAGACA
#AF290891  TATGCTGGAG CTCGTTATTT CGGTTCTTAT GGTGCTAATT TTGATGGAAA AAAAACAGAT CCTAAAGATT CAACCAGACA

#obl/sp1   GGTTACTGAT GCAGGCGCA- ---------- ---------- ---------- ---
#AF290891  GGTTACTGAT GCAGGCGCAT ACAAAGTTCT TTACAGCACT GTTGGTGCAG AAG
```


61