

Leandro Fontes Prezotto

Tipificação de linhagens de *Wolbachia* do complexo *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) da Região Neotropical por análise de locos múltiplos.

Typification of *Wolbachia*'s strains in the complex *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) from the Neotropical Region by analysis of multiple loci.

São Paulo

2012

Leandro Fontes Prezotto

Tipificação de linhagens de *Wolbachia* do complexo *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) da Região Neotropical por análise de locos múltiplos.

Typification of *Wolbachia*'s strains in the complex *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) from the Neotropical Region by analysis of multiple loci.

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Genética e Biologia Evolutiva.

Orientadora: Prof^a. Dr^a.

Denise Selivon-Scheepmaker

São Paulo

2012

Prezotto, Leandro Fontes
Tipificação de linhagens de *Wolbachia*
do complexo *Anastrepha fraterculus*
(Diptera: Tephritidae) da Região
Neotropical por análise de locos
múltiplos.

102 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo. Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva.

1. Moscas-das-Frutas 2. MLST 3. *wsp*
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).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Denise Selivon-Scheepmaker
Orientador(a)

Aos meus pais,

"I don't want to believe. I want to know."

Carl Sagan
(1934-1996)

Agradecimentos

A Prof^a. Dr^a. Denise Selivon-Scheepmaker, por aceitar me orientar e pela ajuda e incentivo ao longo da execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. André Luiz Paranhos Perondini, pela ajuda e incentivos nos momentos decisivos deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Ribeiro Vilela por ceder o microscópio usado para tirar as fotos das lâminas.

Aos amigos que estão ou que passaram pelo laboratório: Ester, Fernando, Júlia, Paula, Pietro e Roberto, pela ajuda em diversos momentos deste trabalho.

A Elzi, técnica do laboratório, e ao Walmir, motorista do Instituto, pela ajuda nas coletas e manutenção do material biológico.

Aos meus pais, Tarcisio e Regina, e irmãs, Renata e Carolina, pelo carinho e apoio dado, principalmente nos momentos mais difíceis.

Apoio Financeiro Capes (bolsa institucional de Doutorado) e FAPESP (Projeto 10/52040-8).

Índice

Introdução	01
Objetivos	13
Material e Métodos	14
Amostras utilizadas	14
Extração de DNA	18
Amplificação dos fragmentos de genes	18
Eletroforese	19
Sequenciamento de DNA	19
Análise das sequências	20
Estabelecimento de linhagens de <i>Anastrepha</i> isentas (curadas) de <i>Wolbachia</i>	21
Análise de efeitos da <i>Wolbachia</i> em <i>A. sp.1</i> e em <i>A. obliqua</i>	22
Resultados	25
1. Caracterização de linhagens de <i>Wolbachia</i>	25
2. "Multilocus Sequence Typing" (MLST)	25
2.1. Gene <i>gatB</i>	26
2.2. Gene <i>coxA</i>	30
2.3. Gene <i>hcpA</i>	31
2.4. Gene <i>ftsZ</i>	33
2.5. Gene <i>fbpA</i>	34
2.6. Comparação entre as filogenias dos cinco genes do MLST	36
2.7. Sequências dos cinco genes concatenadas	38
3. Análise do gene <i>wsp</i>	42
4. Comparação entre as filogenias do MLST (genes concatenados) e do gene <i>wsp</i>	52
5. Análise de efeitos da <i>Wolbachia</i> em <i>A. sp.1</i> e em <i>A. obliqua</i>	56
Morfologia dos ovários	56
Produção de espermatozoides	56
Fecundidade	58
Fertilidade	59
Discussão	61
Resumo	68
Abstract	70
Referências Bibliográficas	71
Anexos	94

Introdução

As bactérias *Wolbachia* têm atraído um grande interesse nas últimas décadas, principalmente por sua vasta abundância e efeitos fascinantes sobre seus hospedeiros, que vão desde a manipulação reprodutiva, mutualismo e potenciais aplicações em controles de pragas e vetores de doenças (Werren *et al.* 2008; Brelsfoard & Dobson, 2011). As bactérias *Wolbachia* são membros da ordem Rickettsiales, um grupo diverso de bactérias intracelulares que compreendem espécies com relações parasitárias, mutualistas e comensais com seus hospedeiros (Werren *et al.* 2008). As “rickettsias” são bactérias parasitas encontradas em íntima associação com os tecidos de seus hospedeiros e os membros desta família pertencem à subdivisão “Alpha” de Proteobacteria (Weiss & Moulder, 1984; Weisburg *et al.*, 1989; Werren, 1997). Filogenias baseadas em sequências do gene ribossômico 16S mostraram que as *Wolbachia* são monofiléticas em relação a outras “rickettsias” (Noda, 1984; Breeuwer *et al.* 1992; Southamer & Luck, 1993) e posicionam-se filogeneticamente como grupo irmão de *Ehrlichia*, que é grupo-irmão de *Rickettsia* (Werren, 1997).

Descrita inicialmente em tecidos reprodutivos do mosquito *Culex pipiens* por Hertig & Wolbach (1924) e posteriormente definida como *Wolbachia pipientis* (Hertig, 1936), essas bactérias infectam principalmente artrópodes, diferentemente das “rickettsias”, que são bactérias patogênicas a vertebrados (Anderson & Karr, 2001). Nos anos 1950, Ghelelovitch (1952) e Laven (1951, 1959, 1967) descobriram que nos mosquitos *Culex*, diversos cruzamentos interespecíficos eram incompatíveis. Laven (1959, 1967) sugeriu uma ligação entre esta incompatibilidade a um padrão de herança citoplasmática, herdado maternamente, chamando-a de incompatibilidade citoplasmática (IC). Posteriormente, Yen & Barr (1971) ao eliminarem a bactéria com o antibiótico tetraciclina, observaram o desaparecimento do efeito de IC. Nos anos seguintes, a existência de IC foi novamente observada, como por exemplo, em besouros (Hsiao & Hsiao, 1985; O’Neil, 1989; Leu, 1989; Wade & Stevens, 1995; Werren, 1997), vespas parasitoides (Richardson *et al.*, 1987); gafanhotos (Noda, 1984; Noda, 1987), *Drosophila* (Hoffman *et al.*, 1986; Hoffmann, 1988; Binnington & Hoffmann, 1989; Hoffman & Turelli, 1988; Loius & Nigro, 1989) e moscas-das-frutas (*Rhagoletis cerasi*) (Riegler & Staufer, 2002).

Estudos filogenéticos baseados nos genes ribossômicos 16S e do ciclo celular *ftsZ* indicaram que o gênero *Wolbachia* engloba oito supergrupos taxonômicos (“A” a “H”) (Breeuwer *et al.* 1992; Stouthamer & Luck, 1993; Werren *et al.* 1995, Lo *et al.*,

2002, Casiraghi *et al.*, 2005). A definição rigorosa de supergrupo não existe, nem há um critério padrão para a atribuição de um novo supergrupo. Um supergrupo é geralmente definido como um conjunto de linhagens filogeneticamente relacionadas, embora tipo e número de genes utilizados para as inferências filogenéticas não estejam definidas (Baldo & Werren, 2007). Os supergrupos “A” e “B” são encontrados em artrópodes. Os supergrupos “C” e “D” são encontrados em nematoides (Bandi *et al.*, 1998). O supergrupo “E” é encontrado em Collembola (Vandekerckhove *et al.*, 1999; Czarnetzki & Tebbe, 2004), enquanto que o supergrupo “F” contém bactérias que infectam cupins e espécies do gênero *Mansonella* (Lo *et al.*, 2002). O supergrupo “G” é encontrado em aranhas australianas (Rowley *et al.*, 2004), embora tenha sido argumentado que estas cepas são recombinantes entre os supergrupos “A” e “B” ao invés de representarem linhagens distintas (Baldo & Werren, 2007). O supergrupo H é encontrado em cupins (Isoptera) (Bordenstein & Rosengaus, 2005). Outras cepas diversas de *Wolbachia* foram detectadas em pulgas (Siphonaptera) (Gorham *et al.*, 2003), no nematoide filarial *Dipetalonema gracile* (Spirurida) (Casiraghi *et al.*, 2005), no pseudoescorpião *Cordylocheres scorpioides* (Pseudoscorpionida) (Zeh, *et al.*, 2005) e no escorpião *Tityus serrulatus* (Suesdeck-Rocha *et al.*, 2007), porém estas linhagens não foram identificadas quanto a que supergrupo estariam associadas.

Nematoides associados à *Wolbachia* mostram uma concordância entre a filogenia da bactéria e dos hospedeiros, mostrando mutualismo entre eles. Este padrão também é encontrado em muitos outros endossimbiontes herdados verticalmente, como em *Buchnera aphidicola*, simbionte intracelular obrigatório de pulgões (Werren *et al.*, 2008). Em artrópodes, as bactérias *Wolbachia* se comportam geralmente como parasitas reprodutivos, tendo efeitos fenotípicos em seus hospedeiros. Não há concordância entre a filogenia dos artrópodes e a filogenia de *Wolbachia*, o que indica a existência de movimento horizontal da bactéria entre espécies hospedeiras (Werren *et al.*, 2008).

A infestação por *Wolbachia* ocorre em artrópodes de regiões geográficas distintas. Em insetos, por exemplo, foram encontradas infecções em amostras do Panamá, América do Norte, Inglaterra e Indonésia (Werren *et al.*, 1995; West *et al.*, 1998; Werren & Windsor, 2000; Kittayapong *et al.*, 2002), tendo sido observado um relativo equilíbrio entre o grau de infecção nos diferentes continentes (Werren & Windsor, 2000). No Brasil, Lavagnoli *et al.* (2005) encontraram 45% de infecção numa amostragem de insetos de uma área de mata atlântica no litoral Norte do Estado de São Paulo.

Wolbachia é encontrada tanto nos tecidos somáticos quanto nos reprodutivos (Dobson *et al.*, 1999) de diversas espécies de artrópodes e nematódeos (Hilgenboecker *et al.*, 2008). Sua taxa de infecção é estimada em aproximadamente 60% em artrópodes (Hilgenboecker *et al.*, 2008; Baldo *et al.*, 2010), embora Jeyaprakash & Hoy (2000), utilizando a técnica de “Long PCR” a tenham estimado em 76%. Dentro das espécies, Hilgenboecker *et al.* (2008), encontraram uma variação ou muito alta (> 90%) ou muito baixa (< 10%) de indivíduos infectados.

A *Wolbachia* é predominantemente transmitida através da linhagem germinativa feminina (Serbus *et al.*, 2008). A taxa de transmissão mensurada para *Drosophila melanogaster* e *Drosophila simulans* são similares e em torno de 97% de eficiência no campo e 100% em laboratório (Hoffmann *et al.*, 1990; Hoffmann *et al.*, 1998). Nos machos, a bactéria é excluída do esperma maduro, conseqüentemente, sua taxa de transmissão via linhagem germinativa masculina é da ordem de 2% (Hoffmann *et al.*, 1998). Nas fêmeas infectadas, a bactéria está presente na linhagem germinativa durante toda a vida, assegurando a alta fidelidade na transmissão através dos ovos (Serbus, *et al.*, 2008).

Infestações por *Wolbachia* têm sido associadas a diversas alterações na reprodução de seus hospedeiros, como incompatibilidade citoplasmática (IC) em muitas espécies de artrópodes (Wade & Steven, 1985; Brewer *et al.*, 1992; O'Neill *et al.*, 1992; Bourtzis & O'Neill, 1998), partenogênese em Hymenoptera (Stouthamer *et al.*, 1993), feminização de machos genéticos em isópodos (Rigaud *et al.*, 1991; Rousset *et al.*, 1992; Juchault *et al.*, 1994), morte dos machos na prole em Coleoptera (Hurst *et al.*, 1999; Fialho *et al.*, 2000), Lepidoptera (Jiggins *et al.*, 2000), Diptera (Hurst *et al.*, 2000) e Pseudoscorpiones (Zeh *et al.*, 2005).

A incompatibilidade citoplasmática (IC), causada por *Wolbachia*, ocorre entre a célula ovo e o esperma e resulta na morte do zigoto em espécies diploides ou produção de machos em espécies haplodiplóides (Werren, 1997). A IC pode ocorrer em dois modos: unidirecional e bidirecionalmente. O primeiro ocorre quando o esperma de um macho infectado fertiliza um ovo não infectado, sendo que os cruzamentos recíprocos são compatíveis (Werren, 1997). A incompatibilidade bidirecional ocorre tipicamente quando machos e fêmeas infectados por diferentes estirpes são mutuamente incompatíveis (Werren, 1997).

O mecanismo da IC não é conhecido, mas os resultados observados podem ser explicados por um modelo denominado “mod/resc” (Werren, 1997). A IC, aparentemente, envolve dois componentes: a “marcação” do espermatozoide (sistema *mod*) e o “resgate” (sistema *rescue*) no ovo fertilizado. De acordo com este modelo,

durante a espermatogênese, os cromossomos paternos sofrem alguma forma de marcação pela ação de fatores secretados pelas bactérias. Para que o processo da mitose no zigoto se complete, o ovo deve estar infectado pela bactéria de uma mesma linhagem que, ao liberar outro fator (*resc*), realiza um processo de “recuperação” dos cromossomos paternos, viabilizando a singamia e o processo reprodutivo. Se este “resgate” não ocorrer, o ovo e o espermatozoide permanecem incompatíveis (Werren, 1997). O cruzamento incompatível é devido à assincronia dos pró-núcleos masculino e feminino na fase inicial da mitose; o atraso na ruptura do envelope nuclear masculino e fosforilação da histona H3 (uma modificação da histona é requerida para a iniciação da mitose) indica que a actividade de CDK1, uma quinase chave que comanda a célula em mitose, é retardada no pro-núcleo masculino (Reed & Warren, 1995; Lassy & Karr, 1996; Tram & Sullivan, 2002). Como resultado, as cromátides da fêmea estão devidamente condensadas e encontram-se na primeira placa metafásica, mas os cromossomos do espermatozóiide estão em estado semicondensado. Durante a anáfase os cromossomas femininos separam normalmente, enquanto que os pronúcleos masculinos ou são expandidos para os polos do centrosoma ou são excluídos totalmente (Lassy & Karr, 1996; Tram *et al.*, 2006). Em condições normais, em insetos, durante a primeira divisão mitótica, os cromossomos maternos e paternos permanecem separados em regiões distintas da placa metafásica. Os cromossomos permanecem separados durante a anáfase, e só se misturam durante a telófase. Esta organização do fuso, conhecido como o eixo gonométrico, é única para a primeira divisão mitótica em insetos (Callaini *et al.*, 1997; Kawamura, 2001). Em embriões de *Drosophila simulans* com IC, os cromossomos maternos entram na transição metáfase/anáfase, enquanto os paternos permanecem indevidamente condensados permanecendo na metáfase, podendo ser resultado da ativação *checkpoint* do fuso (Callaini *et al.*, 1997; Serbus *et al.*, 2008). Em outras células, a ativação do *checkpoint* do fuso previne a segregação do conjunto de cromossomos. Entretanto, em embriões com IC, metade do eixo gonométrico permanece presa, enquanto a outra entra em anáfase, indicando a segregação independente (Serbus *et al.*, 2008). Um resultado destes cruzamentos incompatíveis é desenvolvimento haploide, observados em moscas, vespas e mosquitos (Werren *et al.*, 2008). Este controle independente da transição metáfase/anáfase explica os diferentes resultados da IC em insetos haplodiploides e diploides. Por exemplo, a IC resulta em morte do embrião em *Nasonia longicornis* e *N. giraulti*, enquanto em *N. vitripennis* resulta em machos haploides (Bordenstein *et al.*, 2003). Este modelo é consistente com as observações tanto de IC unidirecional quanto da bidirecional.

Embora menos comum que a IC, a *Wolbachia* também induz partenogênese (IP) em algumas espécies hospedeiras cujos machos se desenvolvem a partir de ovos não fertilizados, tais como ácaros, himenópteros e tisanópteros (Stouthamer *et al.*, 1990; Weeks & Breeuwer, 2001; Arakaki *et al.*, 2001). Ovos não fertilizados de fêmeas infectadas produzem filhas, que, ao contrário dos machos, são capazes de transmitir as bactérias às gerações seguintes (Serbus *et al.*, 2008). Como na IC, a IP induzida pela *Wolbachia* é causada pela interrupção do ciclo celular no início da embriogênese o que resulta em desenvolvimento diploide em ovos não fertilizados (Serbus *et al.*, 2008). Em *Trichogramma* sp. e *Leptopilina clavipes*, a anáfase é abortiva durante a primeira divisão embrionária resultando em um núcleo diploide em vez de dois núcleos haploides (Stouthamer & Kazmer, 1994; Pannebaker *et al.*, 2004). No ácaro *Bryobia praetiosa* a IP parece ser funcionalmente apomítica alterando a meiose, resultando em gametas diploides (Weeks & Breeuwer, 2001). Em alguns casos, a infecção é polimórfica dentro de uma espécie e os efeitos cromossômicos são suprimidos quando o esperma fertiliza os ovos, ao passo que em outras, a infecção é fixada dentro da espécie, o que resulta na IP induzida por *Wolbachia* (Serbus *et al.*, 2008).

No efeito de feminização causada pela *Wolbachia* em isópodos há a supressão da glândula androgênica, convertendo machos em fêmeas reprodutivas competentes (Rigaud *et al.*, 1991; Rousset *et al.*, 1992; Juchault *et al.*, 1994). Em insetos, a feminização foi descrita em *Eurema hecabe* (Lepidoptera) (Hiroki *et al.*, 2002) e em *Zygnidia pullula* (Hemiptera) (Negri *et al.*, 2008). O mecanismo exato de feminização não está claro, embora em *E. hecabe*, a *Wolbachia* parece interferir com a via de determinação do sexo e deve atuar de forma contínua ao longo do desenvolvimento de feminização completa (Hiroki *et al.*, 2002). Tem sido postulado que a feminização por *Wolbachia* pode levar à evolução de novos sistemas de determinação do sexo, tais como mudanças de fêmea heterogamética para macho heterogamético, embora a evidência conclusiva não fosse demonstrada (Werren & Beukeboom, 1998).

A morte dos machos induzida pela *Wolbachia* ocorre durante a embriogênese (Serbus *et al.*, 2008). Inicialmente, a prole totalmente de fêmeas em *Ostrinia scapularis*, fora descrita como feminização induzida por *Wolbachia*. Porém, Kageyama *et al.* (2002) ao eliminarem a *Wolbachia* das fêmeas com tetraciclina, observaram a produção de prole exclusivamente de machos. Na ausência da *Wolbachia*, fêmeas genéticas morrem durante o desenvolvimento larval, enquanto que na presença da bactéria, machos genéticos são feminizados e morrem durante o desenvolvimento larval (Kageyama *et al.*, 2002). Ainda não está claro em que nível a *Wolbachia* interfere na determinação do sexo ou como isso pode variar entre taxa de hospedeiros diferentes (Serbus *et al.*, 2008). Evidências recentes indicam que algumas mortes de

machos podem chegar a altas frequências, resultando em mudanças nos sistemas de acasalamento para acomodar a escassez de machos (Serbus *et al.*, 2008).

Outros efeitos nos hospedeiros também foram relatados. A *Wolbachia* pode reprimir mutações estéreis e vias apoptóticas das células germinativas dos hospedeiros (Dedeine *et al.*, 2005). Resistência a patógenos foi descrita em *Drosophila melanogaster*. Populações tratadas com tetraciclina para eliminação da bactéria *Wolbachia* e inoculadas com um retrovírus DCV patógeno à *Drosophila* (*Drosophila C Virus*), apresentaram maior taxa de mortalidade que nas populações infectadas com *Wolbachia* (Teixeira *et al.*, 2008; Hedges *et al.*, 2008). Também em *D. melanogaster* e em *D. simulans*, os indivíduos de populações em que a bactéria foi eliminada, foram menos eficazes no acasalamento e respostas a estímulos olfativos (Crespigny *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2008). Em uma população de *D. melanogaster* da Califórnia (EUA), Weeks *et al.* (2007) observaram que fêmeas infectadas eram mais eficazes na fecundidade que fêmeas não-infectadas. Na vespa parasitoide *Asobara tabita*, fêmeas nas quais a bactéria *Wolbachia* fora eliminada, apresentaram apoptose nos ovários, podendo ser um indício de que a bactéria é importante para a ovogênese do hospedeiro (Pannebaker *et al.*, 2007). Em *Culex quinquefasciatus*, além de IC, Almeida *et al.* (2011), observaram desenvolvimento e oviposição tardios de populações nas quais a *Wolbachia* fora eliminada. Além disso, observaram um maior desempenho reprodutivo nas populações tratadas, embora estas tivessem menor longevidade. Estes fatos sugerem que a relação bactéria-hospedeiro pode alterar-se de parasitismo para mutualismo (Pannebaker *et al.*, 2007). Também em *D. simulans*, Snook *et al.* (2000) observaram que machos infectados com *Wolbachia* produziam menor número de cistos de espermatozoides e eram menos férteis que machos não-infectados.

Além destes efeitos, quando linhagens de *Wolbachia* de um hospedeiro são transferidas a outros, diversos efeitos são encontrados. Por exemplo, uma linhagem de *Wolbachia* que causa IC em *Cadra cautella*, quando transferida a *Anagasta kuehniella*, causa morte dos machos nestes hospedeiros (Sasaki & Ishikawa, 2000). Em *Drosophila bifasciata* também causa morte dos machos, mas aqueles que escapam têm baixo nível de IC (Hurst *et al.*, 2000). *Drosophila recens*, naturalmente infectada por *Wolbachia*, na qual induz IC, quando transferida a *Drosophila subquinaria*, o mecanismo de morte dos machos é imediatamente acionado (Jaenike, 2007). Em *Aedes aegypti* infectados com cepas de *Wolbachia* originárias de *D. melanogaster*, são observados efeitos diminuição de longevidade (McMeniman *et al.*, 2009), redução do sucesso na alimentação de sangue (Turley *et al.*, 2009), malformação na probóscide

(Moreira *et al*, 2009b), diminuição na resistência a patógenos (Moreira *et al*, 2009a), aumento da taxa metabólica (Evans *et al*, 2009). Em *Aedes albopictus* foram observadas redução da fecundidade e diminuição na taxa de eclosão quando infectado com linhagens de *Wolbachia* originárias de *Culex pipiens* (Calvitti *et al*, 2010).

Normalmente a transmissão de *Wolbachia* ocorre verticalmente entre indivíduos de mesma espécie através da célula-ovo, da fêmea infectada para sua progênie (Werren, 1997). Entretanto, cepas de *Wolbachia*-A que apresentam sequências idênticas ou muito similares do gene *ftsZ* foram encontradas em hospedeiros das ordens Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera (Werren, 1997), sugerindo fortemente uma transmissão horizontal. A transmissão horizontal também foi detectada em *Wolbachia*-B, na qual as estirpes de *Wolbachia* encontradas em vespas parasitoides (*Nasonia giraulti*) e moscas varejeiras (*Protocalliphora*) estão intimamente relacionadas filogeneticamente (Werren *et al.*, 1995; Werren, 1997). Esses resultados sugerem haver uma transferência destas bactérias entre organismos ecologicamente relacionados que participam de relações presa-predador, parasita-hospedeiro e parasitoide-hospedeiro (Werren, 1997). Diversos experimentos sugerem a ocorrência de transferência horizontal em espécies relacionadas: Vavre *et al.* (1999) encontraram *Leptopilina heterotoma* e *D. simulans* contaminadas com variantes semelhantes de *Wolbachia* (variante 1), o mesmo ocorrendo entre *Asobara tabita* e *D. melanogaster* (variante 2). Baldo *et al.* (2008) detectaram indícios de transferência horizontal em aranhas do gênero *Agelenopsis*. Raychoudry *et al.* (2009) encontraram evidências de transferência da bactéria entre gêneros diferentes de insetos, sendo adquiridas de moscas varejeiras, de vespa *Muscidifurax uniraptor* e de *Drosophila* sp. A transmissão entre clados geneticamente diferentes também foi observada por Panaram & Marshall (2007) ao detectarem a presença do supergrupo F de *Wolbachia*, característico de nematoide, em insetos ortópteros. Kraaijeveld *et al.* (2011) encontraram vários indivíduos de *Leptopilina clavipes*, vespa parasitoide infectada com IP-*Wolbachia*, contaminados com uma única linhagem da bactéria, sugerindo, segundo os autores, que a transmissão horizontal ocorre nos estágios iniciais da infecção. A transferência horizontal de *Wolbachia* por relação parasitoide-hospedeiro foi sugerida entre espécies de *Anastrepha* e microhimenópteros associados por Mascarenhas (2007), que encontrou linhagens idênticas de *Wolbachia* infectando as duas espécies de hospedeiros. Marcon (2009) também encontrou evidências de transferência horizontal entre *Anastrepha* e vespas parasitas de dípteros.

Em várias interações *Wolbachia*-hospedeiros, a transferência horizontal de genes (THG) da *Wolbachia* para seus hospedeiros tem sido reportada, como em *Drosophila ananassae*, *Nasonia vitripennis*, *N. longicornis*, *N. giraulti*, *Brugia malayi*, *Dirofilaria immitis* (Dunning-Hotopp *et al.*, 2007), *Aedes aegypti*, *Ae. mascarensis* (Klasson *et al.*, 2009), *Acanthocheilonema viteae*, *Onchocerca flexuosa* (McNulty *et al.* 2010). O genoma quase completo de *Wolbachia* foi encontrado no segundo cromossomo de *D. ananassae*, sendo que quase 2% dos genes transferidos podem ser transcritos (Dunning-Hotopp *et al.*, 2007). No genoma de vespas parasitoides do gênero *Nasonia* e nos nemátodos do gênero *Onchocerca*, *Brugia* e *Dirofilaria* um pequeno número de genes da *Wolbachia* foi detectado (Dunning-Hotopp *et al.*, 2007). No besouro *Monochanus alternatus* ao menos 14% do genoma da *Wolbachia* é localizado em um cromossomo do hospedeiro (Aikawa *et al.*, 2009). Evento de THG foi observado em *Ae. aegypti*, sendo classificado como transcricionalmente ativo em suas glândulas salivares (Klasson *et al.*, 2009). Em *Anastrepha*, Marcon *et al.* (2011b) identificaram *transposons* do tipo *mariner* nas linhagens de *Wolbachia* que infectam três espécies destas moscas, sugerindo que há troca de fragmentos de DNA entre a bactéria e seus hospedeiros. As inserções dos fragmentos de DNA da *Wolbachia* no hospedeiro podem resultar em novas funções aos genes, a aquisição destes novos genes poderia ocasionar um rearranjo cromossômico no hospedeiro, o que poderia resultar em isolamento reprodutivo (Werren *et al.*, 2008; Marcon, 2009).

No Brasil, Selivon *et al.* (1996) observaram a presença de grande população de bactérias no vitelo e células polares de embriões *Anastrepha* sp.2 *aff. fraterculus*. Posteriormente, com o sequenciamento do gene *ftsZ* do ciclo celular bacteriano, foi demonstrado que tais bactérias pertencem ao gênero *Wolbachia* e que são encontradas nas células germinativas dos embriões e em todas etapas do desenvolvimento da linhagem germinativa das fêmeas, inclusive nos ovos maduros das fêmeas adultas, indicando uma transmissão vertical desta bactéria nesta espécie (Selivon *et al.*, 2002). A presença da bactéria *Wolbachia* também foi observada em uma amostra de população natural e em duas colônias de laboratório de *Ceratitis capitata* (Rocha *et al.*, 2005) e em diversas espécies de *Anastrepha* (Coscrato *et al.*, 2009). Mascarenhas (2007) observou a presença de *Wolbachia* em sete espécies de *Anastrepha* e quatro espécies de Braconídeos associados.

Em moscas-das-frutas, diversos estudos com *Wolbachia* foram feitos, demonstrando incompatibilidade citoplasmática em *Bactrocera ascita* (Jamnongluk *et al.*, 2002), *Rhagoletis cerasi* (Riegler *et al.*, 2002; Zabalou *et al.*, 2004; Charlat *et al.*, 2004), *Ceratitis capitata* (Zabalou *et al.*, 2004). Ribeiro (2009) demonstrou a ocorrência

de incompatibilidade citoplasmática mediada pela bactéria em *Anastrepha* sp.1 aff. *fraterculus* e *Anastrepha obliqua*.

A família Tephritidae congrega espécies que caracteristicamente se desenvolvem em tecidos vegetais vivos. Várias espécies utilizam frutos como substrato alimentar no estágio de larva, adquirindo o status de inseto-praga quando esses frutos são de valor comercial. As espécies-praga pertencem aos gêneros *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Ceratitis*, *Dacus*, *Rhagoletis* e *Toxotrypana* (White & Elson-Harris, 1992). No Brasil as espécies mais importantes pertencem aos gêneros *Anastrepha* e *Ceratitis capitata* (Malavasi *et al.*, 2000).

O gênero *Anastrepha* é endêmico do Continente Americano e compreende 215 espécies descritas distribuídas por toda região Neotropical e parte da Neártica, das quais 112 ocorrem no Brasil (Zucchi, 2007; 2008). Norrbom *et al.* (1999) com base em características morfológicas, agruparam as espécies de *Anastrepha* em dezessete grupos infragenéricos. Posteriormente, os resultados obtidos por Norrbom *et al.* (1999), foram corroborados através das análises do gene ribossomal 16S mitocondrial (McPheron *et al.* 1999) e da região hipervariável do gene *period* (Barr *et al.*, 2005). As espécies registradas no país pertencem a 12 grupos, sendo que os grupos com maior número de espécies são: *fraterculus* e *mucronota* com 17 espécies cada, *pseudoparallella* (9), *robusta* e *spatulata* (5), *serpentina* (5), *daciformis* (4), *dentata*, *grandis* e *punctata* (4), *leptozona* (3) e *benjamini* (1) (Zucchi, 2007, 2008).

As espécies de importância econômica no Brasil são: *A. fraterculus* (Wiedemann), *A. obliqua* (Macquart), *A. sororcula* Zucchi, *A. zenildae* Zucchi e *A. distincta* Greene, que pertencem ao grupo *fraterculus*; *A. grandis* (Macquart) (grupo *grandis*); *A. pseudoparallella* (Loew) (grupo *pseudoparallella*); e *A. bistrigata* Bezzi, *A. serpentina* (Wiedemann) e *A. striata* Schiner (grupo *serpentina*) (Zucchi, 2007).

Dentre os grupos, um dos que tem recebido bastante atenção nos últimos anos é o grupo *fraterculus* por congregar muitas das espécies-praga (White & Elson-Harris, 1992; Aluja, 1994), incluindo *A. fraterculus* (*sensu lato*). Existem várias espécies morfológicamente similares a *Anastrepha fraterculus*, o que pode ser um indicativo de que o grupo infragenérico *fraterculus*, que inclui cerca de 27 espécies, tenha uma história evolutiva recente (Aluja, 1994; McPheron *et al.*, 1999; Norrbom *et al.*, 1999; Smith-Caldas *et al.*, 2001, Selivon *et al.*, 2005).

Dentre estas, a espécie de maior importância econômica é *A. fraterculus* s.l. (Wiedemann), distribuída nas Américas entre as latitudes 35° N e 35° S (Malavasi *et al.*, 2000), abrangendo desde o norte do México ao centro da Argentina e norte do

Chile (Basso *et al.*, 2003) e ilhas do Caribe, ocupando ambientes bastante distintos. É uma espécie generalista sendo que mais de 90 de frutos hospedeiros são conhecidos (Malavasi, 2000; Zucchi, 2007). Como sugerido por Selivon *et al.* (2004b), é possível que esta extensa lista de hospedeiros deva estar relacionada com a dificuldade de reconhecer as diferentes espécies crípticas que integram a espécie nominal *A. fraterculus*.

A possibilidade da existência de espécies crípticas em *A. fraterculus s.l.* foi aventada na década de 1940, quando Stone (1942) reconheceu uma extensa variação na morfologia das asas em amostras desta espécie, mas preferiu considerá-las como raças geográficas. Em 1944, Baker *et al.*, sugeriram que, na verdade, um complexo de espécies crípticas poderia estar envolvido. Estudos posteriores corroboraram estes resultados utilizando diversas características biológicas, como cariótipo (Mendes, 1958; Bush, 1962; Solferini & Morgante, 1987; Morgante *et al.*, 1993); isozimas (Morgante *et al.*, 1980; Steck 1991; Amaral, 1994; Alberti *et al.*, 1999, 2002; Basso *et al.*, 2003); RFLP do DNA mitocondrial (Steck & Sheppard, 1993; Santos, 1994); RNA 16S mitocondrial (McPheron *et al.*, 1999), COI mitocondrial (Smith-Caldas *et al.*, 2001) e o gene nuclear *period* (Barr *et al.*, 2005).

No Brasil, diversos estudos encontraram diferenças nos cariótipos (Selivon *et al.*, 2004a, 2005, Goday *et al.*, 2006), na estrutura dos ovos (Selivon & Perondini, 1998, Selivon *et al.*, 2004a, Figueiredo *et al.*, 2011), em isozimas (Selivon, 1996; Selivon *et al.*, 2005), na morfometria de estruturas dos adultos (Selivon *et al.*, 2004b, 2005), isolamento reprodutivo (Selivon *et al.*, 1999, 2005), no ITS1 (Prezotto, 2008), caracterizando a existência de três espécies no complexo que foram denominadas, provisoriamente por *Anastrepha sp. 1 affinis fraterculus*, *A. sp. 2 aff. fraterculus* e *A. sp. 3 aff. fraterculus*. Além dessas, Selivon *et al.* (2004b) caracterizou outra entidade, *Anastrepha sp. 4 affinis fraterculus*, encontrada em Guayaquil, Equador. Hernández-Ortiz *et al.* (2004) utilizando análise morfométrica (acúleo, asas e mesonoto) e Prezotto (2008) através da caracterização do ITS1, analisando amostras de diversas localidades do México, Peru, Equador, Colômbia, Brasil e Argentina, mostraram que outras espécies devem existir no complexo de espécies crípticas de *A. fraterculus*. Vera e colaboradores (2006) encontraram isolamento reprodutivo entre populações de diversas localidades do Peru e Colômbia e Brasil/Argentina, mas compatibilidade entre Brasil e Argentina. Amostras de *A. fraterculus s.l.* de populações da Argentina e do Peru apresentaram diferenças comportamentais, químicas, citológicas e genéticas, indicando pertencerem a diferentes entidades biológicas (Cáceres *et al.*, 2009). Recentemente, Hernández-Ortiz *et al.* (2012) demonstraram a presença de, ao menos,

sete morfotipos distintos dentro deste complexo de espécies. De acordo com as áreas biogeográficas das Américas, as populações que ocorrem no domínio Mesoamericano (México, Guatemala e Panamá) foram agrupadas em uma única entidade, rotuladas como morfotipo "Mexicano". No noroeste do domínio Sul-americano, as amostras caíram em três grupos distintos: o morfotipo "Venezuelano", com uma única população das planícies do Caribe venezuelano; o "Andino", morfotipo das terras altas da Venezuela e da Colômbia, e o terceiro grupo ou morfotipo "Peruano", compreendendo as amostras das planícies costeiras do Pacífico no Equador (*A. sp.4*) e Peru. Três grupos adicionais foram identificados nas sub-regiões do Chaco e Paranaense correspondentes às três entidades caracterizadas por Selivon *et al.* (2004a, 2005): o morfotipo "Brasileiro-1" (*A. sp.1*) foi reconhecido como o mais comum ao Brasil, incluindo as amostras da Argentina, e amplamente distribuído nessas regiões biogeográficas; o morfotipo "Brasileiro-2" (*A. sp.2*), incluindo duas amostras do estado de São Paulo (Ilhabela e São Sebastião) e o morfotipo "Brasileiro-3" (*A. sp.3*) incluiu uma única população de Botucatu (estado de São Paulo) (Hernández-Ortiz *et al.*, 2012). Com base em dados publicados anteriormente (acima citados) que mostram diferenciação genética e cariotípica, bem como isolamento reprodutivo entre alguns desses grupos, Hernández-Ortiz *et al.* (2012) concluíram que esses morfotipos de fato representam grupos naturais e entidades taxonômicas distintas. Várias espécies de *Anastrepha*, inclusive as três entidades do complexo *fraterculus* no Brasil, estão infectadas pela bactéria *Wolbachia*, como acima apresentado. Além disso, Cáceres e colaboradores (2009) encontraram contaminação com a bactéria *Wolbachia* pertencente ao supergrupo "A" em amostras de populações do Brasil, Argentina e Peru. Uma amostra de região desconhecida apresentou dupla infecção, com cepas do supergrupo "A" e cepas do supergrupo "B" de *Wolbachia*. Recentemente, Martínez *et al.* (2012) encontraram infecção de *Wolbachia* pertencentes ao supergrupo "B" em *Anastrepha striata* do México.

Estudos que sequenciaram o genoma da *W. pipientis* mostraram que esta bactéria possui recombinação gênica (Wu *et al.*, 2004) e que várias espécies de artrópodes estão infectados por *Wolbachia* dos supergrupos "A" e "B" (Werren *et al.*, 1995; Werren & Windsor, 2000), o que poderia causar fluxo gênico entre as espécies (Paraskevopoulos *et al.*, 2006). Foi claramente demonstrado que recombinação no gene *wsp* é elevada entre os supergrupos "A" e "B" (Jiggins *et al.*, 2001; Werren & Bartos, 2001; Baldo *et al.*, 2005). Assim, este gene deve ser evitado quando se procura identificar e compreender as relações entre cepas de *W. pipientis* (Paraskevopoulos *et al.*, 2006). Desta forma, uma identificação confiável de cepas

requer uma abordagem do tipo MLST (do inglês, *Multilocus Sequence Typing*). Uma ampla abordagem utilizando essa metodologia foi desenvolvida para *W. pipientis* utilizando cinco “genes de manutenção” (*standard house-keeping genes*): *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *fbpA*, e *ftsZ* (Baldo *et al.*, 2006a; Paraskevopoulos *et al.*, 2006). Os resultados revelaram frequente recombinação e uma notável diversidade entre *W. pipientis*, na qual 35 de 37 haplótipos eram únicos (Baldo *et al.*, 2006a). Recombinação frequente entre cepas intimamente relacionadas é consistente com o fato dessas cepas serem membros de uma única espécie, a *W. pipientis* (Paraskevopoulos *et al.*, 2006).

Um sistema de tipagem suplementar utilizando as regiões hipervariáveis da proteína de superfície Wsp da *Wolbachia* foi também desenvolvido (*Wsp-Typing*). A estrutura do gene *wsp* consiste em quatro regiões hipervariáveis (HVR) intercaladas por regiões conservadas (CR). Porções do gene englobando HVRs e CRs têm sido extensivamente embaralhadas entre as linhagens, gerando haplótipos e sequências extremamente divergentes da proteína (Baldo & Werren, 2007). Segundo esses autores, o gene *wsp* pode ser utilizado para a identificação de haplótipos, mas não seria indicado para a identificação dos supergrupos a que esses haplótipos estariam associados.

Como a *Wolbachia* induz a IC em diversos organismos, foi proposto o seu emprego em programas de erradicação ou supressão de populações de insetos-praga, (Beard *et al.*, 1993; Zabalou *et al.*, 2004). Nessa metodologia, Técnica do Inseto Incompatível (TII), a IC pode ser utilizada para controlar populações naturais de pragas de insetos de uma maneira análoga à Técnica do Inseto Estéril (TIE) (Zabalou *et al.*, 2009; Bredsforsard & Dobson, 2011). Para a aplicação bem-sucedida do TII (com base em uma abordagem IC unidirecional) contra a espécie-alvo, é essencial que as linhagens ou cepas da *Wolbachia* sejam rigorosamente identificadas para que sejam somente liberados machos portadores de uma linhagem de *Wolbachia* distinta da linhagem existente na população alvo.

Como existe a indicação de que a *Wolbachia* pode estar envolvida em efeitos de IC entre populações de *Anastrepha* e no isolamento reprodutivo entre as espécies do complexo (Selivon *et al.*, 2005; Ribeiro, 2009) e também existem evidências que diferentes estirpes de *Wolbachia* podem estar envolvidas (Coscrato, 2009; Mascarenhas, 2007), há a necessidade de uma identificação mais precisas das cepas de *Wolbachia* existentes nessas espécies para que programas de controle populacional dessas espécies-praga possam ser eventualmente efetivados.

Objetivos

Objetivo Geral:

Utilizar as análises pelas metodologias do MLST e do Wsp Typing em buscando a caracterização de diferentes linhagens da *Wolbachia* presentes em amostras do complexo *A. fraterculus* da região Neotropical e realizar experimentos para corroborar a existência de incompatibilidade citoplasmática causada por essa bactéria em linhagens destas espécies.

Objetivos específicos:

- Amplificação e sequenciamento dos genes *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *fbpA*, *ftsZ* de *Wolbachia* nas diferentes amostras do complexo *A. fraterculus*
- Caracterizar as linhagens e *Wolbachia* pelo MLST.
- Detecção de *Wolbachia* nas diferentes amostras por amplificação e sequenciamento do gene *wsp*.
- Caracterização das linhagens pelo Wsp-Typing.
- Estabelecer as relações filogenéticas entre as diferentes estirpes de *Wolbachia* comparando as metodologias MLST e Wsp-Typing.
- Obter linhagens de *A. sp.1* e *A. obliqua* isentas de *Wolbachia* por tratamento térmico.
- Descrever os resultados de cruzamentos intraespecíficos envolvendo as espécies *A. sp.1* e *A. obliqua* isentas e não isentas de *Wolbachia* quanto as taxas de eclosão.
- Observar possíveis diferenças nos ovários e testículos de indivíduos tratados e não tratados de ambas as espécies.

II. Material e Métodos

Amostras utilizadas

Amostras populacionais de espécies do complexo *fraterculus* (*A. sp.1*, *A. sp.2* e *A. sp.3*) coletadas no Vale do Paraíba, litoral norte e região central do estado de São Paulo, sul de Minas Gerais, litoral e parte central do Paraná e norte de Santa Catarina (Tabela I, Figura 1).

Tabela I. Localidade, coordenadas geográficas e hospedeiros das amostras populacionais do complexo *A. fraterculus* coletados em diferentes localidades do Brasil.

Código	Localidade	Coordenadas Geográficas	Hospedeiro	Entidade
Ara	Araraquara (SP)	21°47'38"S 48°10' 33"O	Goiaba (<i>Psidium guajava</i>)	<i>A. sp.1</i>
Ber	Bertioga (SP)	23°51'14"S 46°08'20"O	Chapéu-de-sol (<i>Terminalia cattapa</i>)	<i>A. sp.2</i> <i>A. sp.3</i>
Bot	Botucatu (SP)	22°56'18"S 48°18'25"O	Goiaba	<i>A. sp.1</i>
Ilbi	Ibiúna (SP)	23°39'21"S 47°13'22"O	Goiaba	<i>A. sp.1</i>
Ilb	Ilhabela (SP)	23°48'22"S 45°21'54"O	Goiaba	<i>A. sp.2</i>
Ilc	Ilha Comprida (SP)	24°44'27"S 47°32'24"O	Chapéu-de-sol	<i>A. sp.2</i> <i>A. sp.3</i>
Ita	Itapetininga (SP)	23°35'31"S 48°3'10"O	Goiaba	<i>A. sp.1</i>
Ite	Itanhaém (SP)	24°10'58"S 46°47'20"O	Chapéu-de-sol	<i>A. sp.2</i>
Itr	Itararé (SP)	24°6'54"S 49°20'27"O	Goiaba	<i>A. sp.1</i>
Jac	Jacaré (SP)	23°18'18"S 45°41'16"O	Goiaba	<i>A. sp.1</i>
Jam	Jambeiro (SP)	23°15'14"S 45°07'30"O	Goiaba	<i>A. sp.1</i> <i>A. sp.3</i>
Lor	Lorena (SP)	22°43'51"S 45°07'30"O	Goiaba	<i>A. sp.1</i>
Mir	Mirassol (SP)	20°49'7"S 49°30'30"O	Goiaba	<i>A. sp.1</i>
Pet	Pedro de Toledo (SP)	24°16'30"S 47°13'58"O	Goiaba	<i>A. sp.2</i> <i>A. sp.3</i>
Per	Peruíbe (SP)	24°19'12"S 46°59'52"O	Chapéu-de-sol	<i>A. sp.2</i> <i>A. sp.3</i>
Pir	Piracicaba (SP)	22°43'30"S 47°38'56"O	Goiaba	<i>A. sp.1</i>
Sal	Salesópolis (SP)	23°31'51"S 45°50'30"O	Goiaba	<i>A. sp.1</i>
			Laranja (<i>Citrus sinensis</i>)	<i>A. sp.3</i>
Sis	Santa Isabel (SP)	23°19'00"S 46°13'25"O	Goiaba	<i>A. sp.1</i>
			Laranja	<i>A. sp.2</i>
Slp	São Luís do Paraitinga (SP)	23°13'24"S 45°18'47"O	Goiaba	<i>A. sp.1</i> <i>A. sp.3</i>
Sse	São Sebastião (SP)	23°45'22"S 45°24'54"O	Laranja	<i>A. sp.2</i>
			Chapéu-de-sol	<i>A. sp.3</i>

Tau	Taubaté (SP)	23°01'33"S45°33' 31"O	Laranja	A. sp.2
			Goiaba	A. sp.3
Uba	Ubatuba (SP)	22°46'24"S 45°41'52"O	Chapéu-de-sol	A. sp.2 A. sp.3
Tri	Três Rios (RJ)	22°07'24"S 43°12'47"O	Goiaba	A. sp.1
Ube	Uberlândia (MG)	18°56'46"S 48°13'55"O	Goiaba	A. sp.1
Cai	Caiobá (PR)	25°49'04"S 48°32'34"O	Chapéu-de-sol	A. sp.2 A. sp.3
Gua	Guarapuava (PR)	25°23'42"S 51°27'28"O	Goiaba	A. sp.1
Gut	Guaratuba (PR)	25°52'58"S 48°34'30"O	Chapéu-de-sol	A. sp.2 A. sp.3
Imb	Imbituva (PR)	25°13'48"S 50°36'16"O	Goiaba	A. sp.1
Ira	Iratí (PR)	25°28'10"S 50°39'30"O	Goiaba	A. sp.1
Par	Paranaguá (PR)	25°31'12"S 48°30'32"O	Chapéu-de-sol	A. sp.2
Sen	Sengés (PR)	24°6'46"S 49°27'50"O	Goiaba	A. sp.1
Gum	Guaramirim (SC)	26°28'23"S 49°00'10"O	Goiaba	A. sp.1
Rne	Rio Negrinho (SC)	26°15'14"S 49°31'4"O	Goiaba	A. sp.1 A. sp.3

Além disso, foram utilizadas amostras de outras áreas da Região Neotropical cedidas pelo Dr. Vicente Hernández-Ortiz, do Instituto de Ecología A.C.(Conacyt), Xalapa, Veracruz, México, que estavam conservadas em etanol e mantidas a -20°C. A amostra de Guayaquil (Equador) estava disponível no laboratório e congelada em nitrogênio líquido (Selivon *et al.*, 2004b) (Tabela II, Figura 1).

Tabela II. Localidade, coordenadas geográficas e hospedeiros das amostras populacionais do complexo *A. fraterculus* s.l. e *A. sp.4* coletados em diferentes localidades da América do Sul, Central e do México.

Código	Localidade	Coordenadas	Frutos	Entidade
Mis	Argentina: Misiones, Posadas	27°23'59"S 55°56'01"O	Goiaba	<i>A. fraterculus</i> s.l.
Con	Argentina: Entre Ríos, Concordia	31°23'13"S 58°01'12"O	Goiaba	<i>A. fraterculus</i> s.l.
Tuc	Argentina: Tucumán	27°02'18"S 65°19'13"O	Goiaba	<i>A. fraterculus</i> s.l.
Hmo	Argentina: Tucumán, Horco Molle	26°46'37"S 65°19'49"O	Goiaba	<i>A. fraterculus</i> s.l.
Lmo	Peru: La Molina, colônia de laboratório	12°14'15"S 76°31'50"O	Cherimoia (<i>Annona cherimola</i>)	<i>A. fraterculus</i> s.l.
Piu	Peru: Piura, colonia de laboratório	7°40'23"S 79°12'40"O	Goiaba	<i>A. fraterculus</i> s.l.
Guy	Equador: Guayaquil	2°12'13"S 79°53'50"O	Goiaba	<i>A. sp.4</i>
Tol	Colombia: Ibagué, Tolimá, colônia de laboratório	4°26'11"N 75°11'29"O	café (<i>Coffe arabica</i>)	<i>A. fraterculus</i> s.l.
Guc	Guatemala: Guatemala City	14°36'51"N 90°32'22"O	Goiaba	<i>A. fraterculus</i> s.l.
Tap	Mexico: Chiapas, Tapachula	14°53'47"N 92°10'30"O	Goiaba e Nêspera (<i>Eriobotrya japônica</i>)	<i>A. fraterculus</i> s.l.
Chi	Mexico: Chiapas, San Vicente L. Montebello	16°24'36"N 92°24'31"O	Goiaba	<i>A. fraterculus</i> s.l.
Qur	Mexico: Quintana Roo, Chunhuhub	19°37'39"N 88°38'56"O	Armadilha McPhail	<i>A. fraterculus</i> s.l.
Teo	Mexico: Veracruz, Teocelo	19°23'14"N 96°57'23"O	Goiaba	<i>A. fraterculus</i> s.l.
Apa	Mexico: Veracruz, Apazapan, Apazapan	19°17'0"N 96°36'59"O	Armadilha McPhail	<i>A. fraterculus</i> s.l.
Jic	Mexico: Veracruz, E. Zapata La Jicayna	19°21'44"N 96°39'23"O	Goiaba	<i>A. fraterculus</i> s.l.

Para efeito de comparação com outras espécies de moscas-das-frutas, foram obtida amostras de *Anastrepha obliqua*, coletadas em manga, nas localidades de Bariri (22°04'26"S 48°08'20"O), Botucatu, Ilha Solteira (20°25'58"S 51°20'44"O), Indaiatuba (23°05'24"S 47°13'04"O), Mirassol, Peruíbe, Ribeirão Preto (21°10'40"S 47°38'36"O) e Taubaté (SP). Foi também, utilizada amostra de *Ceratitis capitata* obtida de seriguela (*Spondias purpurea*) coletada em Mirassol.



Figura1: Localidades das amostras coletadas. 1. Uberlândia (MG); 2. Ilha Solteira; 3. Mirassol (SP); 4. Ribeirão Preto (SP); 5. Araraquara (SP); 6. Bariri (SP); 7. Botucatu (SP); 8. Piracicaba (SP); 9. Itapetininga (SP); 10. Ibiúna (SP); 11. Indaiatuba (SP); 12. Santa Isabel (SP); 13. Jacareí (SP); 14. Salesópolis (SP); 15. Jambuí (SP); 16. Taubaté (SP); 17. São Luís do Paraitinga (SP); 18. Lorena (SP); 19. Três Rios (RJ); 20. Ubatuba (SP); 21. Ilhabela (SP); 22. São Sebastião (SP); 23. Bertioga (SP); 24. Itanhaém (SP); 25. Peruíbe (SP); 26. Pedro de Toledo (SP); 27. Ilha Comprida (SP); 28. Paranaguá (PR); 29. Caiobá (PR); 30. Guaratuba (PR); 31. Guaramirim (SC); 32. Rio Negrinho (SC); 33. Guarapuava (PR); 34. Irati (PR); 35. Imbituva (PR); 36. Sengés (PR); 37. Itararé (SP); 38. Misiones (AR); 39. Concórdia (AR); 40. Tucumán (AR); 41. Horco Molle (AR); 42. La Molina (Pe); 43. Piura (Pe); 44. Guayaquil (Eq); 45. Tolima (Co); 46. Guatemala City (Gu); 47. Tapachula (Mx); 48. Quitana Roo (Mx); 49. Teocelo (Mx); 50. Apazapan (Mx); Jicayna (Mx).

Extração de DNA

As extrações de DNA foram realizadas seguindo o método adaptado a partir do protocolo para extração de DNA de *Drosophila* sp. “Single fly DNA extraction” (Jowett *et al.*, 1986). Para cada extração foi utilizado o tórax de um indivíduo, que foi macerado em solução [Tris-HCl 10 mM (pH= 7,5), NaCl 60 mM, EDTA 50 mM], seguida da adição de solução de lise [SDS 1,25 %, Tris-HCl 0,3 M (pH = 9,0), EDTA 0,1 M, sacarose 5 %, proteinase K a 100 µg/ml.] e a mistura foi incubada a 65 °C por 1 hora. Após, o material foi incubado a 4 °C por 45 min, seguido de centrifugação a 12.000 g a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante transferido para outro tubo contendo etanol 100% com o dobro de seu volume para a precipitação do DNA. Após cinco minutos de incubação à temperatura ambiente, as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 g à temperatura ambiente. O precipitado foi seco e re-suspendido em 20 µl de H₂O milli-Q (Millipore) para cada amostra, que foi armazenada a -20°C. As amostras de DNA recém-extraído foram tratadas com RNAase (Ribonuclease A, Sigma) a uma concentração final 100 µg/ml por 1 hora a 37 °C, para eliminar o RNA.

Amplificação dos fragmentos de genes

Os seguintes iniciadores foram utilizados para amplificação dos genes utilizados no MLST: *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *fbpA*, *ftsZ* (Baldo *et al.*, 2006a):

- *gatB*:
F1 (5'-GAK TTA AAY CGY GCA GGB GTT-3')
R1 (5'-TGG YAA YTC RGG YAA AGA TGA-3');
- *coxA*:
F1 (5'-TTG GRG CRA TYA ACT TTA TAG-3')
R1(5'- CT AAA GAC TTT KAC RCC AGT-3');
- *hcpA*:
F1 (5'-GAA ATA RCA GTT GCT GCA AA-3')
R1 (5'- GAA AGT YRA GCA AGY TCT G-3');
- *ftsZ*:
F1 (5'-ATY ATG GAR CAT ATA AAR GAT AG-3')
R1 (5'-TCR AGY AAT GGA TTR GAT AT-3'),
- *fbpA*:
F1 (5'-GCT GCT CCR CTT GGY WTG AT-3')
R1 (5'-CCR CCA GAR AAA AYY ACT ATT C-3')

O ciclo de amplificação utilizado foi de 2 minutos a 94°C, 37 ciclos (30 segundos a 94°C, 45 segundos de hibridação a 54°C para *hcpA*, *gatB*, *ftsZ*, e *coxA*, e 59°C para *fbpA*, 1 minuto e 30 segundos a 72°C), 10 minutos a 72°C.

Para o gene *wsp* os iniciadores foram (Zhou *et al.*, 1998):

wsp 81F (5'TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC3')

wsp 691R (5'AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA3').

Os ciclos de amplificação foram de 2 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos (1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 75°C) e mais 10 minutos a 72°. Em caso de resultado negativo de amplificação para *Wolbachia*, as mesmas amostras de DNA foram amplificadas com os iniciadores do ITS-1 (Prezotto, 2008).

Eletroforese

Alíquotas do DNA foram analisadas por eletroforese em géis de agarose a 1,0% em tampão TAE. A eletroforese foi realizada em cubas horizontais contendo solução TAE 1X como tampão de corrida, por 30 minutos sob tensão elétrica de 60 V e corrente de 60 mA constantes, conforme recomendado por Sambrook *et al* (1989). Os géis foram corados com brometo de etídio a 5 µg/ml, visualizados em um transiluminador UV com filtro vermelho. As imagens dos géis foram digitalizadas em uma câmera digital (Vilber Loumart) e transferidas para computador para análise.

Sequenciamento de DNA

O sequenciamento dos fragmentos amplificados foi feito com os iniciadores DF2 e DR2 (que sequenciam as extremidades 5' e 3' respectivamente) e o "kit" para sequenciamento automático BigDye 2.0 (Applied Biosystems). Gerando, desta forma, uma sequência *forward* e outra *reverse*. Em cada reação de sequenciamento foram usados 200 ng de fragmento amplificado purificado, 1 pmol de um dos iniciadores e 2 µl de BigDye. O programa de reações utilizado no aparelho termociclador Eppendorf foi 2 min a 94 °C, 25 ciclos de 30 s de desnaturação a 94 °C, 30 s de anelamento a 60 °C e 2 min de alongação a 68 °C. A leitura do sequenciamento foi feita em aparelho de sequenciamento automático ABI-377 (Applied Biosystems), e os eletroferogramas foram analisados pelo programa Sequence Navigator (para Macintosh), para comparação das réplicas, eliminação de erros de leitura do sequenciamento e também

para obtenção de alinhamentos entre sequências das amostras de populações de *A. fraterculus*.

Análise das sequências

As sequências obtidas foram analisadas utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.9.0., no qual verificou-se a qualidade das sequências. Em seguida, as sequências obtidas foram alinhadas utilizando o programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) e para análises dos haplótipos foi utilizado o programa DNAsp versão 5.10 (Rozas & Librado, 2009). As sequências que eram similares, indicadas pelo programa, foram eliminadas exceto uma, que foi utilizada como representante daquele conjunto. As análises segundo a metodologia do MLST foram feitas de acordo com Baldo *et al.* (2006a, 2007). Os haplótipos obtidos foram comparados com as sequências depositadas nos banco de dados do MLST (<http://www.pubmlst.org/wolbachia/>) para verificar a qual supergrupo pertenciam e se haviam sequências iguais já depositadas. Nos casos de haplótipos inéditos, as sequências foram enviadas ao banco de dados de *Wolbachia* para obtenção do código de identificação. Os diferentes genes que formam o MLST, foram analisados e concatenados pela ordem - *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *ftsZ* e *fbpA* - para formar o ST (“Strain Type”) que define a linhagem da bactéria (Baldo *et al.* 2007).

As análises do gene *wsp* foram feitas pela metodologia do “Wsp Typing”, como proposto por Baldo *et al.* (2006a). As sequências do *wsp* foram submetidas ao banco de dados do *wsp*, também existente no banco de dados do MLST de *Wolbachia*, para identificação de sequências já anteriormente descritas e para obtenção de novos códigos para as sequências inéditas.

Além do sequenciamento dos cinco genes que formam o MLST e do gene *wsp* de *Wolbachia*, foram incluídas sequências depositadas no banco de dados do MLST de alelos encontrados em diferentes hospedeiros de diferentes regiões (Tabelas III e IX).

As análises filogenéticas foram feitas após a escolha do melhor modelo de substituição determinado pela ferramenta “Procura do Melhor Modelo” (*Find Best Models*) do programa Mega 5.1 (Tamura *et al.*, 2011). Segundo os valores de AICc (*Akaike Information Criterion, corrected*), o melhor modelo foi o GTR (*General Time Reversible*) (Tavaré, 1986), tanto para os cinco genes do MLST quanto para o gene *wsp*. As matrizes de distâncias entre as diferentes sequências dos genes do MLST e para o gene *wsp*, foram geradas no programa Mega 5.1. Para cada gene, três metodologias de análises filogenéticas foram empregadas, a Máxima Verossimilhança, a Neighbor-Joining e o método de parcimônia. As árvores filogenéticas foram

construídas utilizando o método de parcimônia no programa Phylip 3.67: dnapars (Felsenstein, 1989), padrão *default* e com 1000 réplicas de *bootstrap*.

Para o gene *wsp* também foram realizadas algumas análises para evidenciar possíveis eventos de recombinação entre os distintos haplótipos, seguindo-se as recomendações de Baldo *et al.* (2006a, 2007). Para tanto, foi feita (1) a tradução conceitual dos haplótipos obtidos pelo programa BioEdit e procedeu-se o exame visual das sequência de aminoácidos, (2) análises filogenética individualizadas de regiões hipervariáveis e (3) teste de recombinação pelo método do MAXCHI (Maynard-Smith, 1992) implementado no programa RDP3-4.1 ("Recombination Detection Program", Heath *et al.* (2006).

Estabelecimento de linhagens de *Anastrepha* isentas (curadas) de *Wolbachia*

A eliminação de bactérias em *A. sp.1* e em *A. obliqua* foi feita por tratamento térmico, método já estabelecido para *Anastrepha* (Pires, 2005; Ribeiro, 2007). Para tanto, pupas logo após a ecdise pupal, provenientes das colônias mantidas no laboratório, foram colocadas em caixas de plástico contendo vermiculita e transferidas para estufa cuja temperatura fora previamente fixada em 30°C, cuidado tendo sido tomado para evitar a desidratação. As pupas foram mantidas nessa temperatura até a emergência dos adultos. Estes foram separados pelo sexo em caixas de populações (15x15x20 cm) e mantidos em sala com temperatura (25° C), umidade (60-70%) e fotoperíodos (12L:12E) controlados. Para verificação da eficácia do tratamento, foi feita a extração do DNA e reação de sequenciamento com o gene *wsp*. Com esses indivíduos foram estabelecidas colônias não infectadas pela *Wolbachia* para ambas as espécies de hospedeiros.

Análise de efeitos da *Wolbachia* em *A. sp.1* e em *A. obliqua*

Para uma análise de possíveis efeitos da *Wolbachia* nos hospedeiros, foram estudadas quatro características biológicas das duas espécies hospedeiras em indivíduos infectados e curados: análise morfológica dos ovários; produção de espermatozoides; análise da fecundidade das fêmeas e da fertilidade dos ovos.

Essas análises foram feitas utilizando-se indivíduos infectados e outros curados, isentos das bactérias. Como existe descrições de efeitos da temperatura em algumas relações da *Wolbachia* com seus hospedeiros (ver Snook *et al.* 2000), em todos os experimentos realizados neste trabalho, os indivíduos não infectados

(curados) derivaram da geração F1 das colônias não infectadas, de ambas as espécies. Os cruzamentos foram feitos em caixas de populações (15x15x20 cm), contendo cinco casais cada uma (Selivon *et al.*, 2005) e mantidas sob condições controladas, como acima descrito. Para cada espécie, foram feitos quatro tipos de cruzamentos: (1) entre machos e fêmeas infectados; (2) entre machos e fêmeas não infectados; (3) entre fêmeas infectadas e machos não infectados e (4) entre fêmeas não infectadas e machos infectados.

A análise morfológica dos ovários foi feita isoladamente para cada espécie. Fêmeas infectadas e fêmeas não infectadas (cruzamentos 1 e 2 acima), foram coletadas entre os dias 10 a 25 após a emergência. Os ovários foram dissecados em tampão KNT (183mM KCl; 47mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH6,8) (Esteban *et al.*, 1997), colocados entre lâmina e lamínula siliconizada e ligeiramente pressionados. As preparações foram congeladas em nitrogênio líquido, as lamínulas retiradas com o auxílio de uma gilete e a preparação fixada em 100% metanol a -10° C por 15 mim. Após secagem ao ar, as preparações foram coradas pelo 4',6-diamino-2-fenil-indol (DAPI) a 1,5 µg/ml em tampão 2x SSC. Algumas preparações foram coradas pela "Acridina alaranjada" ("Acridine Orange") a 0,25 µg/ml em tampão fosfato, pH 6,8 por 5 mim (mod. de Pannebakker *et al.*, 2007). Após imersão nos tampões respectivos, as preparações foram montadas sob lamínula em uma solução de tampão e glicerol (1:1) contendo n-propilgalato para maior durabilidade da fluorescência. As preparações foram examinadas em microscópio Olympus BX-60 equipado com epifluorescência e as imagens digitalizadas por câmera CCD Leica D100 acoplada ao microscópio. As imagens foram editadas pelo programa PhotoShop 7.0.

A análise da produção de espermatozóides foi feita segundo o protocolo descrito por Snook *et al.* (2000) para *Drosophila sumulans*, com pequenas modificações. Como esses autores descrevem, os testículos são organizados em cistos de espermatogônias cujas células desenvolvem-se sincronicamente e a meiose ocorre sequencialmente, em ondas a partir da extremidade distal do testículo em direção à base, onde os espermatozóides maduros são expulsos para os canais deferentes. Os espermatozóides maduros são muito longos e a contagem precisa do número produzido é difícil e trabalhosa. Assim, utilizaram um índice, referente ao número de espermatozóides produzidos, contando o número de conjuntos de espermatozóides em determinado estágio da espermiogênese. Os estágios da espermiogênese, de cada conjunto de espermátides (de cada cisto), podem ser facilmente identificados em uma preparação de testículos por leve esmagamento entre lâmina e lamínula. Como a espermatogênese ocorre linearmente ao longo dos testículos, cada cisto passa necessariamente pelos estágios da espermiogênese.

Assim, a contagem de cistos em um desses estágios, fornece um índice confiável do número de espermatozoides produzidos. Como em *Anastrepha* a espermatogênese também ocorre sequencialmente, em ondas ao longo dos testículos (Bartolucci *et al.*, 2008), esse método foi utilizado no presente trabalho para análise da produção de espermatozoides nas duas espécies de *Anastrepha* (Figura 2), comparando-se indivíduos infectados e curados. Para tanto, machos foram coletados em dias sucessivos após a emergência e dissecados em tampão KNT. Os testículos foram transferidos para lâmina histológicas, cobertos por lamínula siliconizadas e ligeiramente esmagados. Após congelamento em nitrogênio líquido, remoção da lamínula, fixação em metanol a -10° C por 15 mim e secagem ao ar, as preparações foram coradas pelo DAPI (ver acima) ou então, pelo Giemsa a 5% em tampão fosfato, pH 6,8, por 5 mim. As preparações foram montadas em solução de tampão:glicerina com n-propilgalato para a coloração por DAPI (ver acima) ou com bálsamo do Canadá, para a coloração pelo Giemsa. As preparações coradas pelo DAPI foram examinadas em microscópio de fluorescência como descrito para a análise dos ovários e as preparações coradas pelo Giemsa, examinadas em microscópio Zeiss sob microscopia de luz e cistos, em determinado estágio da espermiogênese, contados com o auxílio de um contador de colônias de bactérias e um tundo de desenho da Zeiss (Perondini, 1971). Os dados obtidos sobre a produção de espermatozoides foram analisados por Análise de variância com dois parâmetros, tratamento (infectados e curados) e dias de amostragens, utilizando o programa Statistica 7.0 (StatSoft, Inc).

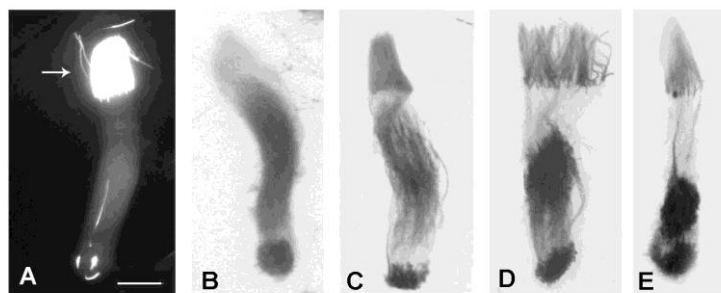


Figura 2. Estágios da espermiogênese de *A. sp.1*. (A) Cisto Corado pelo DAPI onde a seta indica os núcleos dos espermatozoides; (B-E) Estágios sucessivos da espermiogênese corados pelo Giemsa e mostrando a retração do citoplasma das espermatídes; (D) Um cisto com núcleos dos espermatozoides separados durante a preparação do material. Barra em A= 50 μ m e válida para as demais figuras.

As análises da fecundidade das fêmeas e fertilidade dos ovos foram feitas para cada espécie utilizando-se indivíduos derivados dos quatro tipos de cruzamentos acima referidos. De cada tipo de cruzamento foram coletadas amostras de ovos a cada 2-3 dias, durante um mês (15 amostras). Para coleta de ovos, em cada tipo de

cruzamento, foram disponibilizadas semiesferas de ágar a 4%, coloridas com anilina vermelha e recobertas com Parafilm® “M”. Os ovos foram retirados destas semiesferas e transferidos para placas de Petri contendo camada de ágar a 4% e mantidos a temperatura de 25° C, quando foram, então, contados. Cada placa foi monitorada por seis dias seguidos e a eclosão de larvas, registradas (Selivon *et al.* 2005). Assim, a fecundidade foi estimada pelo número de ovos botados e a fertilidade pela taxa de eclosão dos ovos, expressa como a porcentagem de larvas eclodidas a partir do número de ovos botados.

Os dados obtidos quanto ao número de ovos nos diferentes cruzamentos e amostras, foram analisados por testes não paramétricos (Kruskal-Wallis; Mann-Whitney), utilizando o programa GraphPad InStat 2.0 (GraphPad Software, DF Johnson, Rutgers University, 1993). Os dados percentuais das taxas de eclosão foram transformados em $\arcsen\sqrt{P}$ e analisados por análise de variância, seguida do teste de Student-Newman-Keuls e testes t de Student, utilizando-se o programa GraphPad InStat 2.0.

Além disso, para as duas espécies de hospedeiros, foi estimado o índice de incompatibilidade citoplasmática (% IC_{corrigida}) utilizando-se a fórmula de Poinot *et al.* (1998):

$$\% IC_{cor} = [(IC_{obs} - CCM)/(100 - CCM)] \times 100$$

onde, IC_{obs} é a porcentagem de ovos não eclodidos observada nos cruzamentos incompatíveis (cruzamento 4, fêmeas não infectadas cruzadas com machos infectados) e CCM é a mortalidade dos cruzamento compatíveis (cruzamento 3, fêmeas infectadas X machos não infectados).

Resultados

1. Caracterização de linhagens de *Wolbachia*

A caracterização das linhagens da *Wolbachia* foi feita pela amplificação dos cinco genes que formam o MLST (*gatB*, *coxA*, *hcpA*, *fbpA*, *ftsZ*) e pelo gene *wsp*, tendo sido analisadas amostras dos hospedeiros *A. sp.1*, *A. sp.2*, *A. sp.3* do Brasil (Tabela I) e amostras de *Anastrepha fraterculus s.l.* e *A. sp.4* originárias de diferentes regiões do México, América Central e do Sul (Tabela II). Também foram analisadas amostras de *A. obliqua* e *Ceratitis capitata* do Brasil. Foram analisados 292 indivíduos no total e todos estavam infectados pela *Wolbachia*, exceto os espécimens de *C. capitata* (três indivíduos analisados), um indivíduo de cada população de Chiapas, Jicayna, Tapachula e Teocelo (México) e um de Concórdia (Argentina) cuja amplificação foi negativa para *Wolbachia*.

2. "Multilocus Sequence Typing" (MLST)

Foram testados os iniciadores para amplificação dos fragmentos dos genes *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *fbpA*, *ftsZ*, obtendo-se a amplificação de todas amostras testadas (Tabelas II e III), como exemplificados na Figura 3. Os fragmentos amplificados com os cinco genes continham cerca de 500pb, em todas essas amostras, sendo este resultado semelhante ao encontrado por Baldo e colaboradores (2006a) para outras espécies de insetos. Além disso, não houve diferenças significativas no tamanho entre os fragmentos amplificados das diferentes espécies para os genes que formam o MLST.



Figura 3: Fragmentos amplificados dos cinco genes. Marcador GeneRuler™ DNA Ladder. 1: *A. sp.1* Salesópolis; 2: *A. sp.2* Taubaté; 3: *A. sp.3* Ubatuba; B: controle negativo. Abaixo os genes que formam o MLST, *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *ftsZ* e *fbpA*.

A seguir serão apresentados os resultados das análises filogenéticas dos cinco genes. As árvores geradas pelos três métodos foram semelhantes, e a árvore de máxima verossimilhança foi à escolhida para representar as filogenias. Os valores de bootstrap dos três métodos estão indicados nas árvores, sendo o primeiro da máxima verossimilhança, o segundo do *neighbor joining* e o terceiro de parcimônia.

2.1. Gene *gatB*

As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados de MLST de *Wolbachia*. As sequências possuíam 369 bases. Os alelos encontrados nos hospedeiros *A. sp.1* na população de Araraquara, Botucatu, Ibiúna, Itapetininga, Itararé, Jacareí, Jambeiro, Lorena, Mirassol, Piracicaba, Salesópolis, Santa Isabel, São Luís do Paraitinga (SP), Três Rios (RJ), Uberlândia (MG), Guarapuava, Imbituva, Irati, Sengés (PR), Guaramirim e Rio Negrinho (SC); de *A. sp.2* de Bertioga, Ilhabela, Ilha Comprida, Itanhaém, Pedro de Toledo, Peruíbe, São Sebastião, Taubaté, Ubatuba (SP), Caiobá, Guaratuba e Paranaguá (PR); de *A. sp.3* de Bertioga, Ilha Comprida, Jambeiro, Pedro de Toledo, Peruíbe, Salesópolis, São Luís do Paraitinga, Taubaté, Ubatuba (SP), Caiobá, Guaratuba (PR) e Rio Negrinho (SC); de *A. sp.4* de Guayaquil; de *A. fraterculus s.l.* de Apazapan, Chiapas, de Quitana Roo, Tapachula e Teocelo no México; de La Molina e Piura no Peru; Concórdia, Horco Molle e Tucumán na Argentina; de *A. obliqua* de Bariri, Botucatu, Ilha Solteira, Indaiatuba, Mirassol, Peruíbe, Ribeirão Preto e Taubaté (SP) foram iguais ao alelo 1, descrito para o hospedeiro *D. melanogaster* (melEu). O alelo 23, encontrado em Tolima na Colômbia (fraCoTol), é similar ao encontrado nos hospedeiros *Acromis sparsa* do Panamá e em *Odontomachus clarus* dos EUA. Além disso, foram encontrados outros alelos distintos no hospedeiro *A. sp.1* de Jacareí e Salesópolis, um no hospedeiro *A. fraterculus* de Apazapan e Jicayna no México, um na amostra da Guatemala e um em Misiones na Argentina (Tabela III).

Tabela III: Hospedeiros, localidade, número de indivíduos e alelos analisados para os genes que formam o MLST.

Hospedeiro	População	Código	Número de indivíduos	<i>gatB</i>	<i>coxA</i>	<i>hcpA</i>	<i>ftsZ</i>	<i>fbpA</i>	ST	Código Banco de dados MLST	
<i>A. sp.1</i>	Brasil-Araraquara (SP)	sp1BrAra	3	1	1	1	1	1	1	Afra_A_wB14	
	Brasil-Botucatu (SP)	sp1BrBot	5	1	1	1	1	1	1	Afra_A_wB14	
	Brasil-Ibiúna (SP)	sp1BrIbi	5	1	1	1	1	1	1	Afra_A_wB14	
	Brasil-Itapetininga	sp1BrIta	5	1	1	1	3	1	13	Afra_A_wB15	
	Brasil-Itararé (SP)	sp1BrItr	5	1	1	1	1	1	1	Afra_A_wB14	
	Brasil-Jacareí (SP)	sp1BrJac	4	1	1	1	1	1	1	1	Afra_A_wB14
		sp1BrJac	1	199	1	214	1	1	329	Afra_A_wB11	
	Brasil-Jambeiro (SP)	sp1BrJam	5	1	1	1	1	1	1	Afra_A_wB14	
	Brasil-Lorena (SP)	sp1BrLor	2	1	1	1	1	1	1	Afra_A_wB14	
Brasil-Mirassol	sp1BrMir	3	1	1	1	3	1	13	Afra_A_wB15		

	Brasil-Ubatuba (SP)	sp3BrUba	5	1	1	1	162	1	331	Afra_A_wB34
	Brasil-Caiobá (PR)	sp3BrCai	5	1	1	1	1	1	1	Afra_A_wB33
	Brasil-Guaratuba (PR)	sp3BrGut	5	1	1	1	1	1	1	Afra_A_wB33
	Brasil-Rio Negrinho (SC)	sp3BrRne	5	1	1	1	1	1	1	Afra_A_wB33
A. sp.4	Equador-Guayaquil	sp4EqGuy	5	1	1	1	163	1	334	Afra_A_wE41
A. fraterculus s.l.	Mexico-Apazapan	fraMxApa	4	1	1	1	164	1	335	Afra_A_wMx1
		fraMxApa	1	201	1	215	164	1	336	Afra_A_wMx2
	Mexico-Chiapas	fraMxChi	3	1	1	1	165	1	337	Afra_A_wMx3
	Mexico-Jicayna	fraMxJic	4	201	1	1	164	1	346	Afra_A_wMx4
	Mexico-Quitana Roo	fraMxQur	5	1	1	1	165	1	337	Afra_A_wMx5
	Mexico-Tapachula	fraMxTap	5	1	1	1	1	1	1	Afra_A_wMx6
	Mexico-Teocelo	fraMxTeo	4	1	1	216	164	259	338	Afra_A_wMx7
	Guatemala-Guatemala City	fraGuGuc	3	202	192	1	1	1	339	Afra_A_wGu1
	Colombia-Tolima	fraCoTol	3	23	1	86	166	1	340	Afra_A_wCo1
	Peru-La Molina	fraPeLmo	2	1	1	217	1	260	341	Afra_A_wPe1
	Peru-Piura	fraPePiu	2	1	1	1	1	1	1	Afra_A_wPe2
	Argentina-Concórdia	fraArCon	3	1	1	1	1	261	342	Afra_A_wAr1
	Argentina-Horco Molle	fraArHmo	5	1	1	1	167	262	343	Afra_A_wAr2
	Argentina-Tucumán	fraArTuc	2	1	1	1	168	263	344	Afra_A_wAr3
Argentina-Misiones	fraArMis	2	203	1	1	1	264	345	Afra_A_wAr4	
A. obliqua	Brasil-Bariri (SP)	oblBrBar	5	1	1	1	1	1	1	Aobl_A_wBo1
	Brasil-Botucatu (SP)	oblBrBot	5	1	1	1	1	1	1	Aobl_A_wBo1
	Brasil-Ilha Solteira (SP)	oblBrIls	2	1	1	1	1	1	1	Aobl_A_wBo1
	Brasil-Indaiatuba (SP)	oblBrInd	2	1	1	1	1	1	1	Aobl_A_wBo1
	Brasil-Mirassol (SP)	oblBrMir	3	1	1	1	1	1	1	Aobl_A_wBo1
	Brasil-Peruíbe (SP)	oblBrPer	2	1	1	1	1	1	1	Aobl_A_wBo1
	Brasil-Ribeirão Preto (SP)	oblBrRpr	5	1	1	1	1	1	1	Aobl_A_wBo1
	Brasil-Taubaté (SP)	oblBrTau	5	1	1	1	1	1	1	Aobl_A_wBo1
<i>Drosophila melanogaster</i>	Estados Unidos	melEu	1	1	1	1	1	1	1	Dmel_A_wMel
<i>Drosophila simulans</i>		simEu	1	22	23	24	3	23	17	Dsim_A_wRi
<i>Ephesia kuehniella</i>		kueEu	1	7	6	7	3	8	19	Ekue_A
<i>Drosophila bifasciata</i>		bifEu	1	14	15	16	13	15	34	Dbif_A
<i>Agelenopsis aperta</i>		apeEu	1	32	33	38	30	37	65	Aape_A_CDP21
<i>Agelenopsis utahana</i>		utaEu	1	36	32	37	47	35	73	Auta_A_UW21
<i>Agelenopsis longistyla</i>		lonEu	1	52	20	57	58	55	75	Alon_A_NG3
<i>Solenopsis invicta</i>	Argentina	invAr	1	19	20	22	17	20	29	Sinv_A
<i>Aedes albopictus</i>	Tailândia	albTa	1	3	2	2	10	3	2	Aalb_A

<i>Drosophila orientacea</i>	Japão	oriJa	1	10	10	11	14	11	12	Dori_A
<i>Acraea encedon</i>	EUA	encEu	1	9	11	12	11	12	3	Aenc_B_Ugardan

Comparação das distâncias genéticas mostrou que a menor (0.001) foi encontrada entre os alelos 201 (fraMxApa /fraMxJic) do México e 202 (fraGuGuc) da Guatemala. A maior distância (0.069) foi encontrada entre os alelos 199 (sp1BrJac) e 52 (lonEu) (Tabela IV).

Tabela IV: Matriz de distância entre alelos do gene *gatB*.

Código	Alelo	1	199	200	201	202	203	23	22	7	14	32	36	52	19	3
sp1BrJac	199	.0014														
sp1BrSal	200	.005	.020													
fraMxApa /fraMxJic	201	.008	.022	.014												
fraGuGuc	202	.003	.017	.008	.001											
fraArMis	203	.003	.017	.008	.011	.005										
fraCoTol	23	.014	.028	.020	.022	.017	.014									
simEu	22	.026	.040	.031	.034	.028	.028	.041								
kueEu	7	.017	.031	.022	.025	.020	.020	.032	.026							
bifEu	14	.023	.037	.028	.031	.025	.025	.026	.025	.023						
apeEu	32	.028	.043	.034	.037	.031	.031	.032	.032	.035	.023					
utaEu	36	.026	.040	.031	.034	.028	.028	.029	.028	.026	.003	.026				
lonEu	52	.053	.069	.060	.063	.057	.057	.064	.038	.034	.035	.035	.038			
invAr	19	.020	.034	.025	.028	.022	.022	.029	.022	.020	.014	.031	.017	.038		
albTa	3	.020	.034	.025	.028	.022	.020	.023	.017	.020	.014	.038	.017	.044	.011	
oriJa	10	.032	.046	.037	.041	.035	.035	.041	.023	.032	.031	.020	.035	.044	.041	.041

A análise filogenética do *gatB* (Figura 4.I) mostrou que o alelo 52 (lonEu) mostrou ser o mais basal. O alelo 10 (oriJa) ficou próximo ao 32 (apeEu). Próximo a estes, ficou o alelo 7 (kueEu), formando um ramo distinto. Outro ramo é formado pelos alelos 23 (fraCoTol) e 36 (utaEu), que ficaram próximos. Neste ramo, encontra-se a única linhagem de *Wolbachia* presente em *A. fraterculus* que ficou mais distante das demais. Outro ramo é formado pelos alelos 3 (albTa) e 19 (invAr). Os alelos 14 (bifEu) forma um ramo distinto, assim como o 22 (simEu). Os alelos de *Wolbachia* encontrados nos hospedeiros *A. fraterculus* e *A. obliqua* formam um clado distinto, onde o alelo 203 (fraArMis) é o mais basal. O alelo 1 (sp1Br: Ara, Bot, lbi, Ita, ltr, Jac, Jam, Lor, Mir, Pir, Sal, Sis, Slp, Tri, Ube, Gua, lmb, Ira, Sem, Gum, Rne; sp2Br: Ber, llb, llc, lte, Pet, Per, Sse, Tau, Uba, Cai, Gut, Par; sp3Br: Ber, llc, Jam, Pet, Per, Sal, Slp, Tau, Uba, Cai, Gut, Rne; sp4EqGuy; fraMx: Apa, Chi, Qur, Tap, Teo; fraPe: Lmo, Piu; fraAr: Com, Hmo, Tuc; oblBr: Bar, Bot, lls, Ind, Mir, Per, Rpr, Tau; melEu) ficou próximo ao 199 (sp1BrJac), formando um clado distinto. Os alelos 200 (sp1BrSal), 201 (fraMxApa, fraMxJic) e 202 (fraGuGuc) ficaram próximos, formando um clado distinto, sendo o 200 mais basal.

2.2. Gene *coxA*

As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados de MLST de *Wolbachia*. As sequências possuíam 402 bases. Os alelos encontrados nos hospedeiros *A. sp.1* na população de Araraquara, Botucatu, Ibiúna, Itapetininga, Itararé, Jacareí, Jambeiro, Lorena, Mirassol, Piracicaba, Salesópolis, Santa Isabel, São Luís do Paraitinga (SP), Três Rios (RJ), Uberlândia (MG), Guarapuava, Imbituva, Irati, Sengés (PR), Guaramirim e Rio Negrinho (SC); de *A. sp.2* de Bertioga, Ilhabela, Ilha Comprida, Itanhaém, Pedro de Toledo, Peruíbe, São Sebastião, Taubaté e Ubatuba (SP), Caiobá, Guaratuba e Paranaguá (PR); de *A. sp.3* de Bertioga, Ilha Comprida, Jambeiro, Pedro de Toledo, Peruíbe, Salesópolis, Taubaté e Ubatuba (SP), Caiobá, Guaratuba (PR), Rio Negrinho (SC); de *A. sp.4* de Guayaquil; de *A. fraterculus s.l.* de Apazapan, Chiapas, Jicayna, Quitana Roo, Tapachula e Teocelo no México; de Tolima, Colômbia; de La Molina e Piura no Peru; Concordia, Horco Molle e Tucumán na Argentina; de *A. obliqua* de Bariri, Botucatu, Ilha Solteira, Indaiatuba, Mirassol, Peruíbe, Ribeirão Preto e Taubaté (SP) foram muito similares ao alelo descrito para o hospedeiro *D. melanogaster* (melEu). Além disso, foram encontrados outros alelos distintos no hospedeiro *A. sp.1* de Salesópolis, em *A. sp.3* de São Luís do Paraitinga, um no hospedeiro *A. fraterculus s.l.* de da Guatemala (Tabela III).

A menor distância genética foi de 0.005 encontrada entre os alelos 6 (Ekue_A) e 33 (apeEu) e a maior foi de 0.039 entre os alelos 23 (simEu) e 32 (utaEu) (Tabela V).

Tabela V: Matriz de distância entre alelos do gene *coxA*.

Código	Alelo	1	190	191	192	23	6	15	33	32	20	2
sp1BrSal	190	.010										
sp3BrSlp	191	.008	.013									
fraGuGuc	192	.015	.020	.018								
simEu	23	.015	.013	.018	.023							
kueEu	6	.005	.010	.008	.015	.015						
bifEu	15	.008	.013	.010	.018	.018	.008					
apeEu	33	.005	.010	.008	.015	.015	.005	.008				
utaEu	32	.028	.033	.031	.038	.039	.028	.031	.028			
lonEu/ invAr	20	.015	.018	.018	.025	.026	.015	.018	.015	.039		
albTa	2	.018	.023	.020	.028	.028	.018	.020	.018	.031	.028	
oriJa	10	.010	.015	.013	.020	.02	.010	.013	.01	.018	.020	.013

1: alelos sp1Br: Ara, Bot, Ibi, Ita, Itr, Jac, Jam, Lor, Mir, Pir, Sal, Sis, Slp, Tri, Ube, Gua, Imb, Ira, Sem, Gum, Rne; sp2Br: Ber, Ilb, Ilc, Ite, Pet, Per, Sse, Tau, Uba, Cai, Gut, Par; sp3Br: Ber, Ilc, Jam, Pet, Per, Sal, Tau, Uba, Cai, Gut, Rne; sp4EqGuy; fraMx: Apa, Chi, Jic, Qur, Tap, Teo; fraCoTol; fraPe: Lmo, Piu; fraAr: Com, Hmo, Mis, Tuc; oblBr: Bar, Bot, Ils, Ind, Mir, Per, Rpr, Tau; melEu.

Os alelos do gene *coxA* encontrados nos diferentes hospedeiros de *Wolbachia* formam ramos distintos. Os alelos 10 (oriJa) e 32 (utaEu) ficaram próximos, com o 33 (apeEu) mais basal e formando um grupo distinto. Outro ramo é formado pelos alelos 2 (albTa) e 20 (lonEu, invAr) próximos e o 15 (bifEu) mais basal. Os alelos 6 (kueEu) e 23 (simEu) ficaram próximos, formando um ramo distinto. Os alelos de *Wolbachia* encontrados em *Anastrepha* ficaram juntos, formando um grupo distinto. Nele o alelo 1 (sp1Br: Ara, Bot, Ibi, Ita, Itr, Jac, Jam, Lor, Mir, Pir, Sal, Sis, Slp, Tri, Ube, Gua, Imb, Ira, Sem, Gum, Rne; sp2Br: Ber, Ilb, Ilc, Ite, Pet, Per, Sse, Tau, Uba, Cai, Gut, Par; sp3Br: Ber, Ilc, Jam, Pet, Per, Sal, Tau, Uba, Cai, Gut, Rne; sp4EqGuy; fraMx: Apa, Chi, Jic, Qur, Tap, Teo; fraCoTol; fraPe: Lmo, Piu; fraAr: Com, Hmo, Mis, Tuc; oblBr: Bar, Bot, IIs, Ind, Mir, Per, Rpr, Tau; melEu) é o mais basal. O 190 (sp1BrSal) ficou próximo e os 191 (sp3BrSlp) e 192 (fraGuGuc) ficaram próximos (Figura 4.II).

2.3. Gene *hcpA*

As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados de MLST de *Wolbachia*. As sequências possuíam 444 bases. Os alelos encontrados nos hospedeiros *A. sp.1* na população de Araraquara, Botucatu, Ibiúna, Itapetininga, Itararé, Jacareí, Jambeiro, Lorena, Mirassol, Piracicaba, Salesópolis, Santa Isabel, São Luís do Paraitinga (SP), Três Rios (RJ), Uberlândia (MG), Guarapuava, Imbituva, Irati, Sengés (PR), Guaramirim e Rio Negrinho (SC); de *A. sp.2* de Bertioga, Ilhabela, Ilha Comprida, Itanhaém, Pedro de Toledo, Peruíbe, São Sebastião e Ubatuba (SP), Caiobá, Guaratuba e Paranaguá (PR); de *A. sp.3* de Bertioga, Ilha Comprida, Jambeiro, Pedro de Toledo, Peruíbe, Salesópolis, Taubaté e Ubatuba (SP), Caiobá, Guaratuba (PR), Rio Negrinho (SC); de *A. sp.4* de Guayaquil; de *A. fraterculus s.l.* de Apazapan, Chiapas, Jicayna, Quitana Roo, e Tapachula no México; de Guatemala City na Guatemala; de Piura no Peru; Concordia, Horco Molle, Misiones e Tucumán na Argentina; de *A. obliqua* de Bariri, Botucatu, Ilha Solteira, Indaiatuba, Mirassol, Peruíbe, Ribeirão Preto e Taubaté (SP) foram iguais ao alelo descrito para o hospedeiro *D. melanogaster*. Foram encontrados outros alelos no hospedeiro *A. sp.1* da população de Jacareí, outros alelos no hospedeiro *A. fraterculus s.l.* das populações de Apazapan, Teocelo, e La Molina. No hospedeiro *A. fraterculus s.l.* de Tolima, Colômbia, o alelo da *Wolbachia* era o mesmo encontrado em um drosophilideo do Panamá e de outro hospedeiro desconhecido depositado no banco de dados do MLST de *Wolbachia*. (Tabela III).

A menor distância foi de 0.001, encontrada entre os alelo 1 (sp1Br: Ara, Bot, Ibi, Ita, Itr, Jac, Jam, Lor, Mir, Pir, Sal, Sis, Slp, Tri, Ube, Gua, Imb, Ira, Sem, Gum, Rne; sp2Br: Ber, Ilb, Ilc, Ite, Pet, Per, Sse, Tau, Uba, Cai, Gut, Par; sp3Br: Ber, Ilc, Jam, Pet, Per, Sal, Slp, Tau, Uba, Cai, Gut, Rne; sp4EqGuy; fraMx: Apa, Chi, Qur, Tap; fraPePiu; fraAr: Com, Hmo, Tuc, Mis; oblBr: Bar, Bot, Ils, Ind, Mir, Per, Rpr, Tau; melEu) e 214 (sp1BrJac). A maior foi de 0.052 entre os alelos 22 (invAr) e 24 (simEu) (Tabela VI).

Tabela VI: Matriz de distância entre alelos do gene *hcpA*.

Código	Alelo	1	214	215	216	86	217	24	7	16	38	37	57	22	2
sp1BrJac	214	.001													
fraMxApa	215	.002	.005												
fraMxTeo	216	.002	.005	.005											
fraCoTol	86	.009	.011	.007	.011										
fraPeLmo	217	.005	.007	.002	.007	.009									
simEu	24	.009	.011	.007	.011	.014	.009								
kueEu	7	.037	.04	.035	.039	.042	.037	.042							
bifEu	16	.045	.047	.042	.047	.049	.045	.05	.054						
apeEu	38	.028	.03	.025	.03	.033	.028	.033	.042	.025					
utaEu	37	.033	.035	.03	.035	.037	.033	.037	.018	.05	.037				
lonEu	57	.035	.037	.032	.037	.04	.035	.04	.049	.028	.011	.042			
invAr	22	.047	.05	.045	.05	.052	.047	.052	.035	.04	.028	.033	.035		
albTa	2	.045	.047	.042	.047	.05	.045	.05	.028	.042	.03	.025	.037	.007	
oriJa	11	.021	.023	.018	.023	.025	.021	.025	.035	.028	.016	.03	.014	.04	.037

1: alelos sp1Br: Ara, Bot, Ibi, Ita, Itr, Jac, Jam, Lor, Mir, Pir, Sal, Sis, Slp, Tri, Ube, Gua, Imb, Ira, Sem, Gum, Rne; sp2Br: Ber, Ilb, Ilc, Ite, Pet, Per, Sse, Tau, Uba, Cai, Gut, Par; sp3Br: Ber, Ilc, Jam, Pet, Per, Sal, Slp, Tau, Uba, Cai, Gut, Rne; sp4EqGuy; fraMx: Apa, Chi, Qur, Tap; fraPePiu; fraAr: Com, Hmo, Tuc, Mis; oblBr: Bar, Bot, Ils, Ind, Mir, Per, Rpr, Tau; melEu.

Na árvore formada pelo gene *hcpA* (Figura 4. III), os alelos formaram três grupos distintos. Em um deles, o alelo 2 (albTa) é mais basal. Os alelos 22 (invAr) e 57 (lonEu) ficaram próximos e o alelo 86 (fraCoTol) é mais basal, sendo esta a única linhagem de *Wolbachia* encontrada em *Anastrepha* que ficou distante das demais encontradas no mesmo hospedeiro em diferentes localidades, de forma semelhante a ao ocorrido com o gene *gatB*. No outro grupo, os alelos 24 (simEu) e 7 (kueEu) são mais basais, o 16 (bifEu) ficou próximo aos alelos 11 (oriJa) e 37 (utaEu). No terceiro grupo encontram-se as linhagens de *Wolbachia* encontradas no hospedeiro *Anastrepha*. Neste grupo, os alelos 214 e 215 ficaram próximos, formando um ramo. Em outro ramo, os alelos 1 (sp1Br: Ara, Bot, Ibi, Ita, Itr, Jac, Jam, Lor, Mir, Pir, Sal, Sis, Slp, Tri, Ube, Gua, Imb, Ira, Sem, Gum, Rne; sp2Br: Ber, Ilb, Ilc, Ite, Pet, Per, Sse, Tau, Uba, Cai, Gut, Par; sp3Br: Ber, Ilc, Jam, Pet, Per, Sal, Slp, Tau, Uba, Cai, Gut, Rne; sp4EqGuy; fraMx: Apa, Chi, Qur, Tap; fraPePiu; fraAr: Com, Hmo, Tuc, Mis; oblBr: Bar, Bot, Ils, Ind, Mir, Per, Rpr, Tau; melEu) e 217 (fraPeLmo) ficaram próximos e o 216 (fraMxTeo) ficou mais basal perante estes.

2.4. Gene *ftsZ*

As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados de MLST de *Wolbachia*. As sequências possuíam 435 bases. Os alelos encontrados nos hospedeiros *A. sp.1* na população de Araraquara, Botucatu, Ibiúna, Itararé, Jacareí, Jambeiro, Lorena, Piracicaba, Santa Isabel, São Luís do Paraitinga (SP), Três Rios (RJ), Uberlândia (MG), Guarapuava, Imbituva, Irati (PR), Guaratuba e Rio Negrinho (SC); de *A. sp.2* de Bertioga, Ilhabela, Ilha Comprida, Itanhaém, Pedro de Toledo, Peruíbe, São Sebastião e Ubatuba (SP), Caiobá, Guaratuba e Paranaguá (PR); de *A. sp.3* de Bertioga, Ilha Comprida, Jambeiro, Pedro de Toledo, Peruíbe, Salesópolis, São Luis do Paraitinga e Taubaté (SP), Caiobá, Guaratuba (PR), Rio Negrinho (SC); de *A. fraterculus s.l.* de Tapachula no México; de Guatemala City na Guatemala; de La Molina e Piura no Peru; Concordia e Misiones na Argentina; de *A. obliqua* de Bariri, Botucatu, Ilha Solteira, Indaiatuba, Mirassol, Peruíbe, Ribeirão Preto e Taubaté (SP) foram iguais ao alelo descrito para o hospedeiro *D. melanogaster* (melEu). O alelo encontrado em *A. sp.1* da população de Itapetininga, Mirassol e Salesópolis e *A. sp.2* de Taubaté são semelhantes aos encontrados em *Drosophila simulans*, *D. innubila*, *D. munda*, *D. recens*, *Leucophenga maculosa*, *Ragholetis cingulata*, *Suilia* e *Ephestia kuehniella* dos EUA; *Technomirmex albipes* das Filipinas; *Leptomirmex* da Austrália; *Ornipholidotus peucetia* da África do Sul; *Pheidole plagiara* e *P. sauberi* da Tailândia; *Ceutorhynchus neglectus* do Canadá. Além desses, foram encontrados outro alelo de *Wolbachia* no hospedeiro *A. sp.1* de Sengés (SC) e *A. sp.3* de Salesópolis e Ubatuba. Outro alelo foi encontrado em *A. sp.4* de Guayaquil; em *A. fraterculus s.l.* de Apazapan, Chiapas, Quitana Roo e Teocelo, no México; Tolima, na Colômbia; Horco Molle e Tucumán, na Argentina (Tabela III).

A menor distância foi de 0.002, encontrada entre os alelos 3 (sp1Br: Ita, Mir, Sal; sp2BrTau; simEu; kueEu) e 162 (Afra_A: sp1BrSen; sp3Br: sal, Uba) e 3 e 163 (sp4EqGuy). A maior foi de 0.036, entre os alelos 1 (sp1Br: Ara, Bot, Ibi, Itr, Jac, Jam, Lor, Pir, Sis, Slp, Tri, Ube, Gua, Imb, Ira, Gum, Rne; sp2Br: Ber, Ilb, Ilc, Ite, Pet, Per, Sse, Uba, Cai, Gut, Par; sp3Br: Ber, Ilc, Jam, Pet, Per, Sal, Slp, Tau, Cai, Gut, Rne; fraMxTap; fraGuGuc ; fraPe: Lmo, Piu; fraAr: Com, Mis; oblBr: Bar, Bot, Ils, Ind, Mir, Per, Rpr, Tau; melEu) e 167 (fraArHmo) (Tabela VII).

Tabela VII: Matriz de distância entre alelos do gene *ftsZ*.

Código	Alelos	1	3	162	163	164	165	166	167	168	13	30	47	58	17	10
	3	.014														
	162	.016	.002													
sp4EqGu	163	.016	.002	.005												
	164	.014	.005	.007	.007											
fraMxChi	165	.028	.014	.014	.012	.019										
fraMxQur	166	.021	.007	.009	.005	.012	.012									
fraCoTol	167	.036	.021	.024	.019	.026	.016	.019								
fraArHmo	168	.026	.012	.014	.009	.016	.007	.009	.014							
fraArTuc	13	.028	.014	.016	.012	.019	.014	.012	.021	.012						
bifEu	30	.021	.007	.009	.009	.012	.016	.009	.023	.014	.021					
apeEu	47	.029	.011	.011	.008	.016	.009	.014	.017	.011	.012	.016				
utaEu	58	.011	.014	.016	.018	.014	.014	.018	.023	.016	.014	.014	.018			
lonEu	17	.022	.005	.007	.009	.007	.007	.009	.014	.007	.005	.005	.009	.014		
invAr	10	.018	.021	.023	.025	.023	.023	.025	.030	.023	.021	.021	.025	.016	.021	
albTa	14	.009	.011	.014	.016	.014	.014	.016	.021	.014	.011	.011	.016	.007	.011	.014
oriJa																

1: alelos sp1Br: Ara, Bot, Ibi, Itr, Jac, Jam, Lor, Pir, Sis, Slp, Tri, Ube, Gua, Imb, Ira, Gum, Rne; sp2Br: Ber, Ilb, Ilc, Ite, Pet, Per, Sse, Uba, Cai, Gut, Par; sp3Br: Ber, Ilc, Jam, Pet, Per, Sal, Slp, Tau, Cai, Gut, Rne; fraMxTap; fraGuGuc ; fraPe: Lmo, Piu; fraAr: Com, Mis; oblBr: Bar, Bot, Ils, Ind, Mir, Per, Rpr, Tau; melEu. 3: sp1Br: Ita, Mir, Sal; sp2BrTau; simEu; kueEu. 162: Afra_A: sp1BrSen; sp3Br: sal, Uba. 164: fraMx: Apa, Jic, Teo.

A árvore formada pelo gene *ftsZ* (Figura 4.IV) não agrupou todos alelos encontrados em *Anastrepha*. Os alelos 17 (invAr) e 58 (lonEu) ficaram próximos, mais basal a estes ficou o 30 (apeEu), os três alelos formando um grupo. O alelo 10 (albTa) formou um ramo separado. O alelo 1 (sp1Br: Ara, Bot, Ibi, Itr, Jac, Jam, Lor, Pir, Sis, Slp, Tri, Ube, Gua, Imb, Ira, Gum, Rne; sp2Br: Ber, Ilb, Ilc, Ite, Pet, Per, Sse, Uba, Cai, Gut, Par; sp3Br: Ber, Ilc, Jam, Pet, Per, Sal, Slp, Tau, Cai, Gut, Rne; fraMxTap; fraGuGuc ; fraPe: Lmo, Piu; fraAr: Com, Mis; oblBr: Bar, Bot, Ils, Ind, Mir, Per, Rpr, Tau; melEu) formou um ramo separado, ficando, este alelo de *Wolbachia*, distante dos demais encontrados em *Anastrepha*. Os alelos 14 (oriJa) e 47 (utaEu) ficaram próximos, formando um clado distinto. Outro ramo é formado pelos alelos “mexicanos” 164 (fraMx: Apa, Jic, Teo) e 165 (fraMxChi, fraMxQur). O alelo 13 (bifEu) forma um ramo distinto. Outro clado é formado pelos alelos 3 (sp1Br: Ita, Mir, Sal; sp2BrTau; simEu; kueEu) e 162 (Afra_A: sp1BrSen; sp3Br: sal, Uba). Outro grupo é formado pelos alelos 168 (fraArTuc), mais basal, 166 (fraCoTol) e 163 (sp4EqGuy) e 167 (fraArHmo) próximos.

2.5. Gene *fbpA*

As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados de MLST de *Wolbachia*. As sequências possuíam 429 bases. Os alelos encontrados nos hospedeiros *A. sp.1* na população de Araraquara, Botucatu, Ibiúna, Itapetininga, Itararé, Jacareí, Jambeiro, Lorena, Mirassol, Piracicaba, Salesópolis, Santa Isabel, São Luís do Paraitinga (SP), Três Rios (RJ), Uberlândia

(MG), Guarapuava, Imbituva, Irati, Sengés (PR), Guaramirim e Rio Negrinho (SC); de *A. sp.2* de Bertioga, Ilhabela, Ilha Comprida, Itanhaém, Pedro de Toledo, Peruíbe, São Sebastião, Taubaté e Ubatuba (SP), Caiobá, Guaratuba e Paranaguá (PR); de *A. sp.3* de Bertioga, Ilha Comprida, Jambuí, Pedro de Toledo, Peruíbe, Salesópolis, Taubaté e Ubatuba (SP), Caiobá, Guaratuba (PR), Rio Negrinho (SC); de *A. sp.4* de Guayaquil; de *A. fraterculus s.l.* de Apazapan, Chiapas, Jicayna, Quitana Roo e Tapachula, no México; de Guatemala City, de Tolima, Colômbia e de Piura, no Peru; de *A. obliqua* de Bariri, Botucatu, Ilha Solteira, Indaiatuba, Mirassol, Peruíbe, Ribeirão Preto e Taubaté (SP) foram iguais ao alelo descrito para o hospedeiro *D. melanogaster* (melEu). Foram encontrados outros alelos em *A. sp.1* de Salesópolis, *A. sp.3* de Salesópolis, *A. fraterculus s.l.* de Teocelo, no México, La Molina, no Peru, Concórdia, Horco Molle, Tucumán e Misiones, na Argentina (Tabela III).

A menor distância foi de 0.002, encontrada entre os alelos 257 (sp1BrSal) e 259 (fraMxTeo) e entre os alelos 257 e 260 (fraPeLmo). A maior (0.086) foi encontrada entre os alelos 1 (sp1Br: Ara, Bot, Ibi, Ita, Itr, Jac, Jam, Lor, Mir, Pir, Sal, Sis, Slp, Tri, Ube, Gua, Imb, Ira, Sem, Gum, Rne; sp2Br: Ber, Ilb, Ilc, Ite, Pet, Per, Sse, Tau, Uba, Cai, Gut, Par; sp3Br: Ber, Ilc, Jam, Pet, Per, Sal, Slp, Tau, Uba, Cai, Gut, Rne; sp4EqGuy; fraMx: Apa, Chi, Jic, Qur, Tap; fraGuGuc ; fraPePiu; oblBr: Bar, Bot, Ils, Ind, Mir, Per, Rpr, Tau; melEu) e 15 (bifEu) (Tabela VIII).

Tabela VIII: Matriz de distância entre alelos do gene *fbpA*.

Código	Alelo	1	257	258	259	260	261	262	263	264	23	8	15	37	35	55	20	3
sp1BrSal	257	.022																
sp3BrSal	258	.034	.012															
fraMxTeo	259	.024	.002	.014														
fraPeLmo	260	.024	.002	.014	.005													
fraArCon	261	.041	.021	.034	.024	.024												
fraArHmo	262	.041	.019	.031	.021	.021	.021											
fraArTuc	263	.070	.046	.054	.048	.048	.029	.031										
fraArMis	264	.081	.059	.067	.061	.061	.046	.054	.031									
simEu	23	.075	.051	.059	.054	.053	.033	.036	.005	.036								
kueEu	8	.078	.056	.064	.059	.059	.043	.051	.029	.012	.034							
bifEu	15	.086	.064	.072	.067	.067	.056	.059	.041	.024	.046	.017						
apeEu	37	.072	.051	.059	.054	.053	.038	.046	.024	.012	.029	.009	.021					
utaEu	35	.072	.048	.056	.051	.051	.031	.033	.002	.034	.007	.031	.044	.026				
lonEu	55	.040	.014	.021	.018	.017	.006	.014	.006	.003	.011	.010	.009	.025	.018			
invAr	20	.078	.056	.064	.059	.059	.043	.051	.029	.012	.034	.046	.054	.048	.048	.029		
albTa	3	.081	.059	.067	.061	.061	.046	.054	.031	.018	.017	.006	.014	.006	.003	.011	.009	
oriJa	11	.081	.059	.067	.061	.061	.046	.054	.031	.041	.021	.034	.024	.024	.024	.002	.014	.056

1: alelos sp1Br: Ara, Bot, Ibi, Ita, Itr, Jac, Jam, Lor, Mir, Pir, Sal, Sis, Slp, Tri, Ube, Gua, Imb, Ira, Sem, Gum, Rne; sp2Br: Ber, Ilb, Ilc, Ite, Pet, Per, Sse, Tau, Uba, Cai, Gut, Par; sp3Br: Ber, Ilc, Jam, Pet, Per, Sal, Slp, Tau, Uba, Cai, Gut, Rne; sp4EqGuy; fraMx: Apa, Chi, Jic, Qur, Tap; fraGuGuc ; fraPePiu; oblBr: Bar, Bot, Ils, Ind, Mir, Per, Rpr, Tau; melEu.

Na árvore do *fbpA* três grandes grupos são encontrados (Figura 4. V). Em um deles, o alelo 3 (albTa) é mais basal. O alelo 37 (apeEu) ficou próximo aos alelos 20 (invAr) e 55 (lonEu). Outro grupo é formado pelos alelos 15 (bifEu), mais basal e pelos alelos 11 (oriJa) e 35 (utaEu) próximos. O terceiro grupo é formado pelos demais alelos, nos quais o alelo 23 (simEu) forma um ramo mais basal. O alelo 8 (kueEu)

forma um ramo distinto. Outro ramo é formado pelo alelo 259 (fraMxTeo). O alelo 1 (sp1Br: Ara, Bot, Ibi, Ita, Itr, Jac, Jam, Lor, Mir, Pir, Sal, Sis, Slp, Tri, Ube, Gua, Imb, Ira, Sem, Gum, Rne; sp2Br: Ber, Ilb, Ilc, Ite, Pet, Per, Sse, Tau, Uba, Cai, Gut, Par; sp3Br: Ber, Ilc, Jam, Pet, Per, Sal, Slp, Tau, Uba, Cai, Gut, Rne; sp4EqGuy; fraMx: Apa, Chi, Jic, Qur, Tap; fraGuGuc ; fraPePiu; oblBr: Bar, Bot, IIs, Ind, Mir, Per, Rpr, Tau; melEu) forma um ramo distinto. Os alelos 258 (sp3BrSal) e 260 (fraPeLmo) ficaram próximos, formando um clado distinto. Outro clado é formado pelos alelos 264 (fraArMis), mais basal. O alelo 262 (fraArHmo) forma um ramo distinto. O alelo 261 (fraArCon) ficou próximo aos alelos 257 (sp1BrSal) e 263 (fraArTuc)

2.6. Comparação entre as filogenias dos cinco genes do MLST

Existem discrepâncias entre as filogenias dos cinco genes quanto às posições relativas das amostras nas árvores, muito embora os alelos de *Wolbachia* obtidos de *A. fraterculus* se agrupam em todas elas (Figuras 4. I a V). As comparações foram feitas tomando-se a filogenia do gene *gatB* como base.

Nota-se que na árvore do gene *coxA* (Figuras 4.I e 4.II), os alelos 36 (utaEu) e 23 (fraCoTol), que formavam um ramo em *gatB*, separam-se agora. Os alelos 7 (kueEu), 10 (oriJa) e 32 (apeEu), que formavam um ramo distinto, separam-se na árvore do gene *coxA*, na qual o alelo kueEu fica mais distante. Os alelos 3 (albTa) e 19 (inAr) permanecem juntos, formando um ramo em ambas filogenias. O grupo formado pelas linhagens de *Wolbachia* encontradas na *Anastrepha* permanece formando um grupo distinto, embora, internamente, hajam mudanças.

Na árvore do gene *hcpA*, em relação aos grupos formados no gene *gatB*, nota-se que o grupo formado as linhagens invAr e albTa separou-se. O mesmo ocorrendo com a linhagem apeEu, que se separou das linhagens oriJa e kueEu. Também ficaram separadas as linhagens fraCoTol e utaEu. As linhagens encontradas em *Anastrepha* permanecem juntas (Figuras 4. I e 4.III).

Na árvore do gene *fstZ*, os grupos encontrados no gene *gatB* separaram-se. As linhagens invAr e albTa ficaram distantes. Assim como apeEu, oriJa e kueEu. O grupo formado pelas linhagens fraCoTol e utaEu ficou separado (Figuras 4.I e 4.IV).

Em relação aos grupos formados na árvore do gene *gatB*, nota-se que no gene *fpbA* as linhagens invAr e albTa ficaram separadas, porém dentro de um mesmo grupo. O grupo formado pelas linhagens apeEu, oriJa e kueEu separou-se. O mesmo ocorrendo pelo formado pelas linhagens fraCoTol e utaEu. O grupo formado pelas linhagens encontradas em *Anastrepha* permaneceu junto (Figuras 4.I e 4.V).

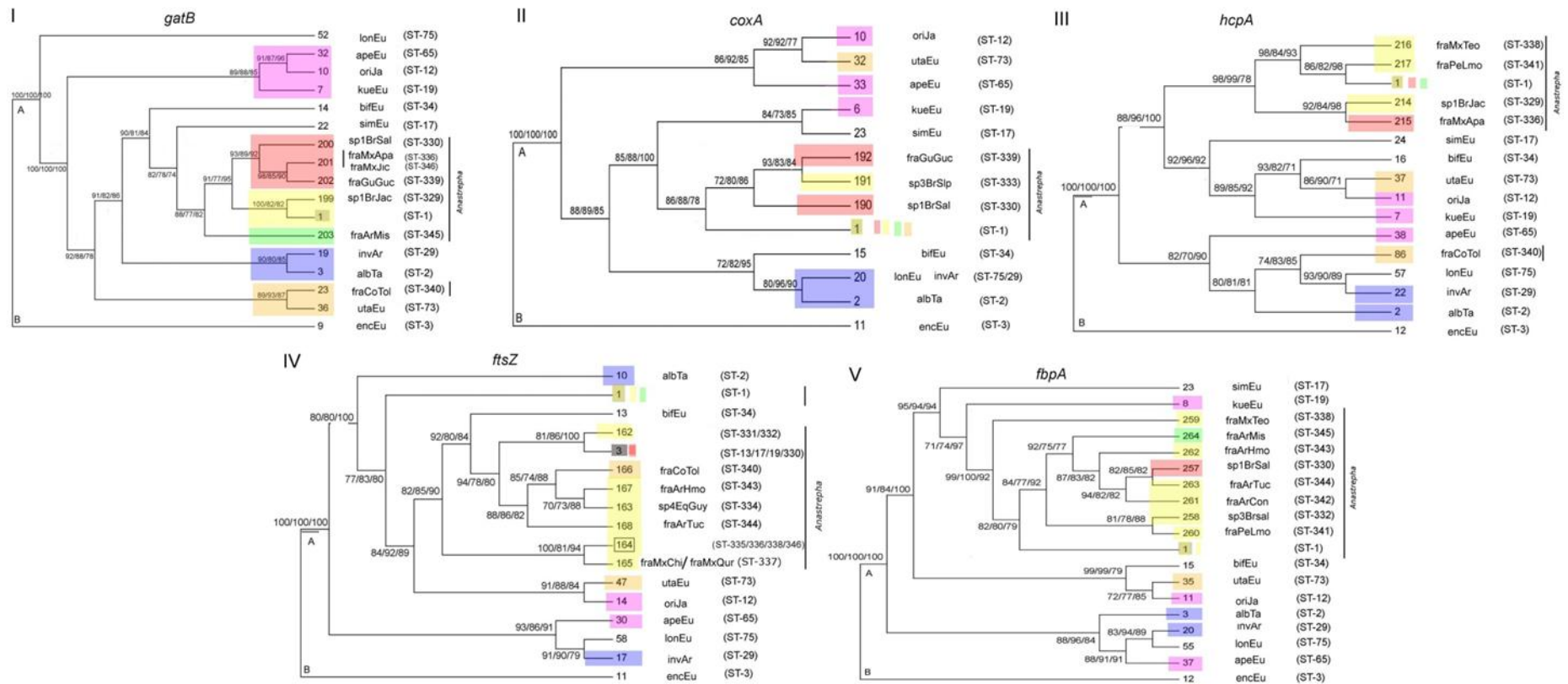


Figura 4: Filogenia dos genes do MLST. I: Árvore filogenética do gene *gatB*. II: Árvore filogenética do gene *coxA*. III: árvore filogenética do gene *hcpA*. IV: Árvore filogenética do gene *ftsZ*. V: Árvore filogenética do gene *fbpA*. Em colorido, os grupos formados relativos à filogenia do gene *gatB*. Por exemplo, em lilás, o grupo com os alelos 7 (kueEu), 10 (oriJa) e 32 (ageEu) em *gatB* estão separados nas demais filogenias. A: alelos do supergrupo "A". B: alelo do supergrupo "B".

2.7. Sequências dos cinco genes concatenadas

As sequências obtidas de cada gene foram concatenadas pela ordem dos genes, *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *ftsZ* e *fbpA*, gerando sequências com 2.079 bases, de acordo com Baldo *et al.* (2006). Estas foram analisadas pelo programa DnaSP 5.10 (Rozas *et al.*, 2009) definindo os haplótipos encontrado na *Wolbachia* (Tabela III). De acordo com os resultados obtidos, o haplótipo 1 é encontrado em: *A. sp.1* das populações de Araraquara, Botucatu, Ibiuna, Itararé, Jacareí, Jambeiro, Lorena, Piracicaba, Santa Isabel, São Luís do Paraitinga (SP), Três Rios (RJ), Uberlândia (MG), Guarapuava, Imbituva, Irati (PR), Guaramirim, Rio Negrinho (SC); em *A. sp.2* das populações de Bertioga, Ilhabela, Ilha Comprida, Itanhaém, Pedro de Toledo, Peruíbe, São Sebastião, Ubatuba (SP), Caiobá, Guaratuba, Paranaguá (PR); em *A. sp.3* das populações de Bertioga, Ilha Comprida, Jambeiro, Pedro de Toledo, Peruíbe, Salesópolis, Taubaté, Ubatuba (SP), Caiobá, Guaratuba (PR), Rio Negrinho (SC); em *A. fraterculus s.l.* das populações de Tapachula, no México, Piura, no Peru e nas populações de *A. obliqua* de Bariri, Botucatu, Ilha Solteira, Indaiatuba, Mirassol, Peruíbe, Ribeirão Preto e Taubaté (SP). Este haplótipo é similar ao Dmel_A_wMel encontrado em *Drosophila melanogaster*. Além deste, foi encontrado o haplótipo 13 em *A. sp.1* de Itapetininga, Mirassol e Salesópolis e em *A. sp.2* de Taubaté. Este haplótipo é encontrado também nos hospedeiros *Drosophila recens*, *Leucophenga maculosa*, *Siullia* dos Estados Unidos; em *Rhagoletis cingulata*, da Alemanha, em um díptero não especificado do Japão, em Sphaeroceridae, Tabanidae e Phoridae dos EUA, drosophilídeo do Panamá e EUA e em Calyptrate do Panamá. Outros haplótipos distintos foram encontrados *A. sp.1* de Jacareí, Salesópolis (SP), Sengés (PR); em *A. sp.3* de Salesópolis, São Luís do Paraitinga e Ubatuba (SP); *A. sp.4* de Guayaquil, no Equador; *A. fraterculus s.l.* de populações de Apazapan, Chiapas, Jicayna, Quitana Roo e Teocelo, no México; de Guatemala City; Tolima, Colômbia; La Molina, no Peru e em Concórdia, Horco Molle, Tucumán e Misiones, na Argentina.

Na comparação das divergências entre os haplótipos, encontrou-se que a menor distância foi entre os haplótipos 330 (sp1BrSal) e 333 (sp3BrSlp) (0.001) e a maior, entre os haplótipos 13 (sp1Br: Ita, Mir, Sal; sp2BrTau) e 65 (apeEu) (0.058) (Tabela IX).

Tabela IX: Matriz de distância entre haplótipos das sequencias dos genes concatenados

Código	Haplótipos	1	13*	329	330	331	332	333	334	335	336	337	346	338	339	340	341	342	343	344	345	17	19	34	65	73	75	29	2				
	13*	.019																															
sp1BrJac	329	.023	.007																														
sp1BrSal	330	.019	.003	.007																													
sp1BrSen	331	.023	.007	.012	.005																												
sn3BrUba	332	.020	.004	.009	.003	.007																											
sp3BrSlp	333	.018	.002	.008	.001	.004	.003																										
sp4EqGuy	334	.021	.005	.010	.004	.008	.005	.004																									
fraMxApa	335	.021	.005	.009	.004	.008	.003	.003	.005																								
fraMxApa	336	.028	.012	.017	.011	.015	.012	.011	.013	.012																							
fraMxChi	337	.047	.031	.035	.030	.034	.030	.029	.030	.030	.031																						
fraMxOur	346	.028	.012	.016	.011	.015	.011	.010	.012	.011	.009	.032																					
fraMxJic	338	.027	.010	.014	.010	.014	.010	.009	.011	.011	.014	.030	.014																				
fraMxTeo	339	.020	.004	.008	.003	.007	.003	.002	.004	.004	.011	.030	.011	.010																			
fraGuGuc	340	.018	.001	.006	.002	.006	.003	.002	.004	.003	.011	.029	.010	.008	.002																		
fraCoTol	341	.027	.011	.016	.010	.014	.011	.010	.012	.011	.015	.035	.014	.010	.010	.010																	
fraArCon	342	.030	.014	.019	.013	.017	.014	.013	.014	.014	.017	.033	.016	.010	.011	.013	.014																
fraArHmo	343	.019	.003	.007	.002	.006	.002	.001	.003	.003	.010	.029	.010	.009	.002	.001	.009	.012															
fraArTuc	344	.029	.015	.019	.014	.018	.014	.013	.015	.015	.018	.038	.018	.014	.014	.013	.011	.017	.013														
fraArMis	345	.037	.021	.026	.020	.024	.021	.020	.022	.021	.024	.040	.023	.017	.019	.020	.018	.013	.019	.018													
simEu	17	.039	.024	.028	.023	.027	.024	.023	.025	.024	.027	.045	.027	.020	.023	.023	.023	.025	.022	.017	.020												
kueEu	19	.046	.031	.035	.030	.034	.031	.030	.032	.031	.029	.051	.028	.032	.030	.030	.034	.036	.028	.028	.034	.029											
bifEu	34	.045	.029	.033	.028	.032	.029	.027	.030	.029	.033	.049	.032	.022	.028	.027	.028	.029	.026	.020	.025	.015	.027										
apeEu	65	.055	.058	.043	.039	.042	.039	.038	.040	.040	.038	.059	.037	.037	.039	.038	.040	.039	.037	.036	.033	.026	.021	.029									
utaEu	73	.048	.033	.037	.032	.036	.033	.032	.034	.033	.030	.052	.029	.031	.032	.032	.034	.034	.030	.030	.031	.025	.020	.026	.014								
lonEu	75	.045	.030	.033	.029	.032	.029	.028	.030	.030	.022	.049	.026	.032	.029	.028	.030	.034	.027	.024	.029	.023	.018	.026	.022	.016							
invAr	29	.046	.030	.033	.029	.032	.029	.028	.030	.030	.033	.049	.033	.022	.029	.028	.028	.029	.027	.022	.022	.014	.026	.011	.030	.031	.030						
albTa	2	.039	.021	.024	.019	.022	.020	.019	.021	.020	.021	.021	.022	.019	.019	.019	.022	.022	.017	.019	.017	.017	.016	.017	.018	.017	.012	.019					
oriJa	12	.019	.003	.007	.002	.006	.002	.001	.003	.003	.010	.029	.010	.009	.002	.001	.009	.012	.047	.031	.035	.030	.034	.030	.029	.030	.030	.031	.028				

1: alelos sp1Br: Ara, Bot, Ibi, Itr, Jac, Jam, Lor, Pir, Sis, Slp, Tri, Ube, Gua, Imb, Ira, Gum, Rne; sp2Br: Ber, Ilb, Ilc, Ite, Pet, Per, Sse, Uba, Cai, Gut, Par; sp3Br: Ber, Ilc, Jam, Pet, Per, Sal, Tau, Cai, Gut, Rne; fraMxTap; fraPePiu; oblBr: Bar, Bot, Ils, Ind, Mir, Per, Rpr, Tau; melEu. 13*: sp1Br: Ita, Mir, Sal; sp2BrTau.

Na árvore filogenética da Figura 5, nota-se o haplótipo 2 (albTa) formando um clado distinto, mais basal e o 65 (apeEu) próximo aos haplótipos 29 (invAr) e 75 (lonEu). Outro grupo é formado pelos haplótipos 34 (bifEu), que forma um ramo mais basal, e os haplótipos 12 (oriJa) e 73 (utaEu) próximos. O haplótipo 19 (kueEu) forma um ramo distinto. Assim como o 17 (simEu). Os haplótipos de *Wolbachia* encontrados nas diferentes espécies de *Anastrepha* formam um grupo distinto. O haplótipo 340 (fraCoTol) forma um ramo mais basal. O haplótipo 344 (fraArTuc) ficou próximo aos 334 (sp4EqGuy) e 343 (fraArHmo), formando um clado distinto dentro deste grupo. Outro ramo é formado pelos haplótipos 330 (sp1BrSal), mais basal e 333 (sp3BrSlp) e 339 (fraGuGuc) próximos. Outro ramo é formado pelos haplótipos 1 (sp1Br: Ara, Bot, lbi, ltr, Jac, Jam, Lor, Pir, Sis, Slp, Tri, Ube, Gua, Imb, Ira, Gum, Rne; sp2Br: Ber, llb, llc, lte, Pet, Per, Sse, Uba, Cai, Gut, Par; sp3Br: Ber, llc, Jam, Pet, Per, Sal, Tau, Cai, Gut, Rne; fraMxTap; fraPePiu; oblBr: Bar, Bot, lls, Ind, Mir, Per, Rpr, Tau; melEu) e 329 (sp1BrJac) próximos e 345 (fraArMis) mais basal. Os haplótipos 341 (fraPeLmo) e 342 (fraArCon) formam um ramo distinto. Outro clado é formado pelos haplótipos 331 (sp1BrSen, sp3BrUba) e 332 (sp3BrSal) próximos e pelo 13 (sp1Br: Ita, Mir, Sal; sp2BrTau) mais basal. Os haplótipos encontrados no México formam um grupo distinto, no qual o haplótipo 337 (fraMxChi, fraMxQur) é mais basal. Outro ramo é formado pelos haplótipos 335 (fraMxApa) e 338 (fraMxTeo) próximos. Os haplótipos 336 (fraMxApa) e 346 (fraMxJic) formam outro ramo.

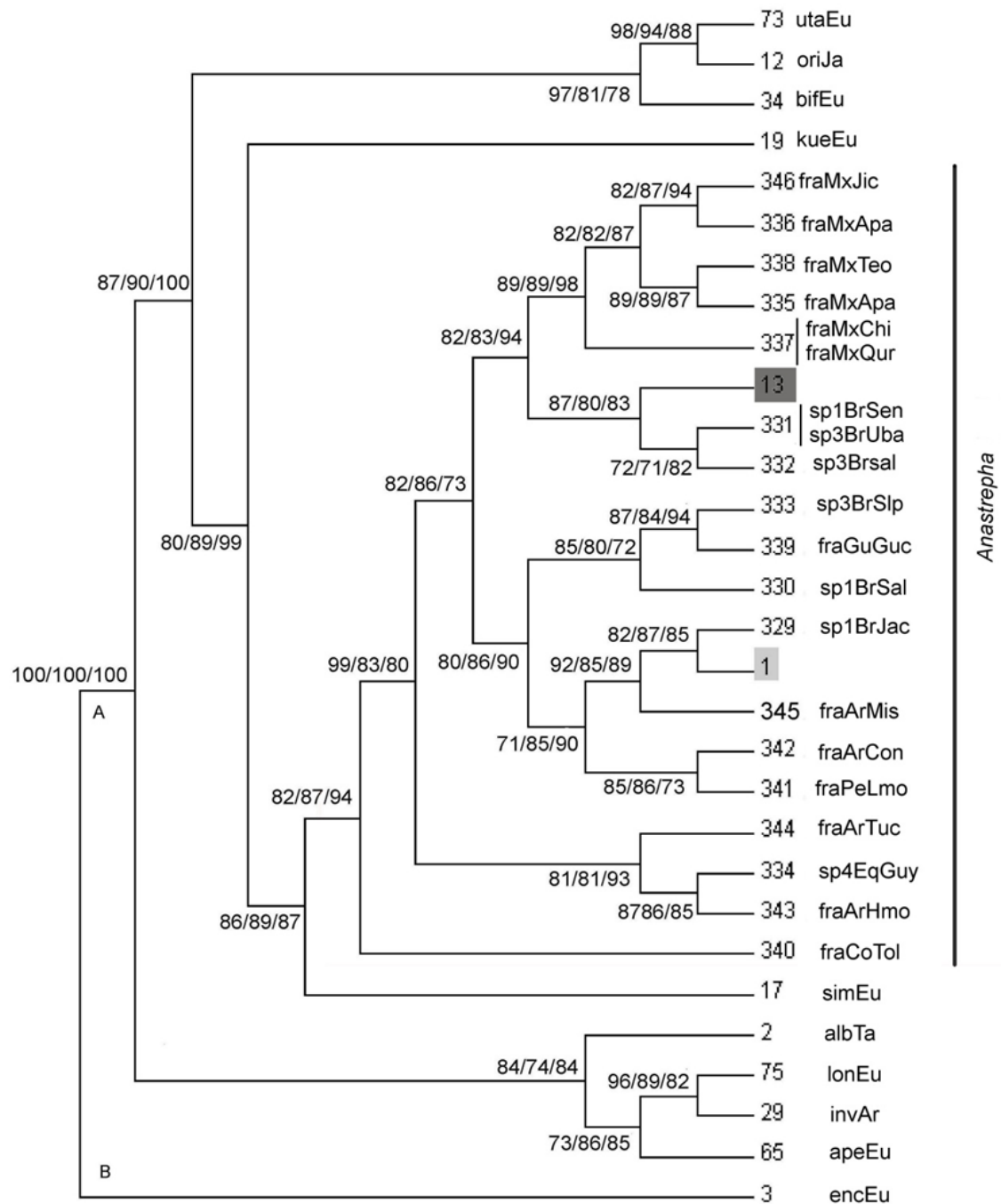


Figura 5. Árvore filogenética dos genes concatenados. A: alelos do supergrupo "A". B: alelo do supergrupo "B". 1: alelos sp1Br: Ara, Bot, Ibi, Itr, Jac, Jam, Lor, Pir, Sis, Slp, Tri, Ube, Gua, Imb, Ira, Gum, Rne; sp2Br: Ber, Ilb, Ilc, Ite, Pet, Per, Sse, Uba, Cai, Gut, Par; sp3Br: Ber, Ilc, Jam, Pet, Per, Sal, Tau, Cai, Gut, Rne; fraMxTap; fraPePiu; oblBr: Bar, Bot, Ils, Ind, Mir, Per, Rpr, Tau; melEu. 13: sp1Br: Ita, Mir, Sal; sp2BrTau.

3. Análise do gene *wsp*

A análise do gene *wsp* foi feita a partir das amostras do complexo *fraterculus* e de *A. obliqua* que foram utilizadas para a identificação das linhagens de *Wolbachia* pela metodologia do MLST (Tabela I), como descritas no item 2 deste trabalho. Foram estudados 292 indivíduos distribuídos pelas 22 amostras, como mostra a Tabela X e a amplificação resultou em fragmentos de ≈ 600 pb para todos os espécimes (Figura 6).

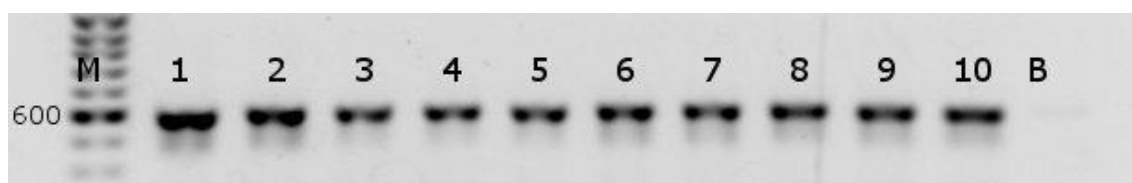


Figura 6: Fragmento amplificado genes *wsp*. Marcador GeneRuler™ DNA Ladder. 1: *A. sp.1* Salesópolis; 2: *A. sp.2* Taubatê; 3: *A. sp.3* Ubatuba; 4: *A. sp.4* Guayaquil; 5: *A. fraterculus* Apazapan; 6: *A. fraterculus* Chiapas; 7: *A. fraterculus* Guatemala City; 8: *A. fraterculus* Tolima; *A. fraterculus* Piura; 9: *A. fraterculus* Concórdia; 10: *A. fraterculus* Tucumán; B: controle negativo.

A comparação das sequências obtidas com os dados depositados no banco de sequências do gene *wsp* de *Wolbachia* (<http://pubmlst.org/wolbachia/>), mostrou que todas eram sequências do gene *wsp* dessa bactéria. As sequências do *wsp* tinham cerca de 500 pb e foram analisadas pelo programa DnaSP 5.0, que identificou a existência de 22 haplótipos distintos (Tabelas X e XI).

A Figura 7 mostra que o nível de variabilidade de nucleotídeos não é uniforme ao longo do gene, formando um padrão com quatro regiões hipervariáveis, "HVRs" (sigla em inglês) separadas por regiões conservadas, "CRs", como ocorre usualmente com esse gene em linhagens de *Wolbachia* de outros hospedeiros (Baldo *et al.*, 2006). Este padrão se repete na variabilidade observada nas sequências de aminoácidos, obtidas pela tradução conceitual das sequências de nucleotídeos e mostradas na Figura 8: as maiores diferenças entre as sequências ocorrem nas HVRs e são espaçadas por regiões conservadas (CRs) nas proteínas.

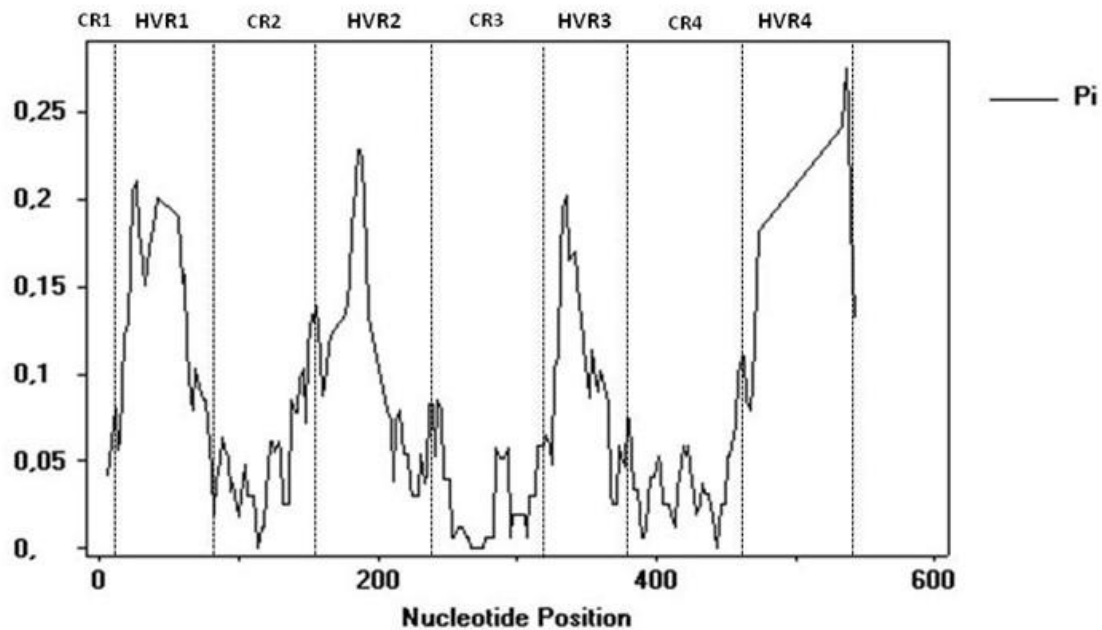


Figura 7. Divergência de nucleotídeos (Pi) do alinhamento das sequências do *WSP*. Quatro picos são identificados, correspondendo aos quatro HVRs.

Pela metodologia do "*Wsp Typing*" a caracterização dos diferentes haplótipos e dos supergrupos da *Wolbachia* é feita pela análise de cada HVR isoladamente (Baldo *et al.*, 2006a). Assim, os dados de cada HVR das sequências de *Anastrepha* foram submetidos ao "*Wsp gene GeneBank*" que identificou as quatro HVRs de cada sequência atribuindo um código numérico a cada uma, como mostrado na Tabela X. O conjunto desses quatro números, por sua vez, identifica o haplótipo (ou linhagem) da *Wolbachia* e sugere a qual supergrupo a linhagem tem maior afinidade. Por exemplo, na sequência obtida de *A. sp.1* coletada em Araraquara, as quatro HVRs foram identificadas com os códigos, HVR1 = 1, HVR2 = 12, HVR3 = 21 e HVR4 = 24. Assim, este conjunto 1, 12, 21 e 24, define o haplótipo 31 que corresponde ao *wsp* da *Wolbachia* do grupo A encontrada em *Drosophila melanogaster* (melEu). A Tabela X lista os 22 haplótipos encontrados no complexo *fraterculus* e os dois de *A. obliqua*, indicando que todas as sequências encontradas pertencem ao supergrupo A da *Wolbachia*.

O haplótipo 31 (melEu) é o mais comum e foi encontrado na maioria das amostras de *Wolbachia*: no hospedeiro *A. sp.1* das populações coletadas em Araraquara, Botucatu, Ibiúna, Itararé, Jacareí, Jambeiro, Lorena, Mirassol, Piracicaba, Salesópolis, Santa Isabel, São Luís do Paraitinga (SP), Três Rios (RJ), Guarapuava (PR) e Guaramirim (SC); em *A. sp.2* de Bertioga, Ilhabela, Ilha Comprida, Itanhaém, Peruíbe, São Sebastião, Taubaté, Ubatuba (SP) e Paranaguá (PR); *A. sp.3* de Bertioga, Ilha Comprida, Jambeiro, Peruíbe, Salesópolis, São Luís do Paraitinga, Taubaté, Ubatuba

(SP) e Caiobá (PR); *A. sp.4* de Guayaquil, Equador; *A. fraterculus s.l.* de Chiapas, Quitana Roo, Tapachula, no México; Guatemala City; Tolima, na Colômbia; La Molina e Piura, no Peru; Concórdia, Horco Molle e Tucumán na Argentina; *A. obliqua* de Bariri, Botucatu, Ilha Solteira, Indaiatuba, Peruíbe, Ribeirão Preto e Taubaté.

O haplótipo 23 foi encontrado nas populações do hospedeiro *A. sp.2* de Pedro de Toledo, Ubatuba (SP), Guaratuba (PR) e em *A. sp.3* de Pedro de Toledo (SP), este haplótipo também é descrito para *Nasonia longicornis*, para Sphaeroceridae, *Suillia*, *Leucophenga maculosa* dos EUA, em *Rhagoletis cingulata* da Alemanha, entre outros. Além desses, foram encontrados haplótipos únicos, que não haviam sido descritos para *Wolbachia*, nas populações de *A. sp.1* de Itapetininga (SP), Uberlândia (MG), Imbituva, Irati, Sengés (PR), Rio Negrinho (SC); em *A. sp.2* de Pedro de Toledo (SP), Caiobá (PR); em *A. sp.3* de Pedro de Toledo, Salesópolis (SP), Guaratuba (PR), Rio Negrinho (SC); em *A. fraterculus s.l.* de Apazapan, Chiapas, Jicayna, Tapachula e Teocelo (México), em Misiones (Argentina) e em *A. obliqua* de Mirassol (SP) (Tabela X).

Tabela X: Hospedeiros, localidade, número de indivíduos e alelos analisados para o gene *wsp*.

Hospedeiro	População	Código	Número de indivíduos	wsp	HVR1	HVR2	HVR3	HVR4	Linhagem
A. sp.1	Brasil-Araraquara (SP)	sp1BrAra	3	31	1	12	21	24	Afra_A_wB11
	Brasil-Botucatu (SP)	sp1BrBot	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wB11
	Brasil-Ibiúna (SP)	sp1BrIbi	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wB11
	Brasil-Itapetininga	sp1BrIta	5	640	218	252	21	24	Afra_A_wB12
	Brasil-Itararé (SP)	sp1BrItar	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wB11
	Brasil-Jacareí (SP)	sp1BrJac	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wB11
	Brasil-Jambeiro (SP)	sp1BrJam	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wB11
	Brasil-Lorena (SP)	sp1BrLor	2	31	1	12	21	24	Afra_A_wB11
	Brasil-Mirassol (SP)	sp1BrMir	3	31	1	12	21	24	Afra_A_wB11
	Brasil-Piracicaba (SP)	sp1BrPir	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wB11
	Brasil-Salesópolis (SP)	sp1BrSal	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wB11
	Brasil-Santa Isabel (SP)	sp1BrSis	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wB11
	Brasil-São Luís do Paraitinga (SP)	sp1BrSlp	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wB11
	Brasil-Três Rios (RJ)	sp1BrTri	3	31	1	12	21	24	Afra_A_wB11
	Brasil-Uberlândia (MG)	sp1BrUbe	4	641	219	12	21	19	Afra_A_wB13
	Brasil-Guarapuava (PR)	sp1BrGua	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wB11
	Brasil-Imbituva (PR)	sp1BrImb	5	658	226	253	21	277	Afra_A_wB14
Brasil-Irati (PR)	sp1BrIra	5	659	1	12	21	278	Afra_A_wB15	
Brasil-Sengés	sp1BrSen	5	642	1	255	21	278	Afra_A_wB16	

	(PR)								
	Brasil-Guaramirim (SC)	sp1BrGum	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wB11
	Brasil-Rio Negrinho (SC)	sp1BrRne	5	643	1	12	21	24	Afra_A_wB17
A. sp.2	Brasil-Bertioga (SP)	sp2BrBer	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wB21
	Brasil-Ilhabela(SP)	sp2BrIlb	4	31	1	12	21	24	Afra_A_wB21
	Brasil-Ilha Comprida (SP)	sp2BrIlc	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wB21
	Brasil-Itanhaém (SP)	sp2BrIte	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wB21
	Brasil-Pedro de Toledo (SP)	sp2BrPet	3	23	1	12	21	19	Afra_A_wB22
		sp2BrPet	2	644	1	12	21	19	Afra_A_wB23
	Brasil-Peruíbe (SP)	sp2BrPer	3	31	1	12	21	24	Afra_A_wB21
	Brazil-São Sebastião (SP)	sp2BrSse	1	31	1	12	21	24	Afra_A_wB21
	Brazil-Taubaté (SP)	sp2BrTau	4	31	1	12	21	24	Afra_A_wB21
	Brazil-Ubatuba (SP)	sp2BrUba	4	31	1	12	21	24	Afra_A_wB21
		sp2BrUba	1	23	1	12	21	19	Afra_A_wB22
	Brasil-Caiobá (PR)	sp2BrCai	5	645	1	12	21	279	Afra_A_wB23
	Brasil-Guaratuba (PR)	sp2BrGut	5	23	1	12	21	19	Afra_A_wB22
	Brasil-Paranaguá (PR)	sp2BrPar	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wB21
A. sp.3	Brasil-Bertioga (SP)	sp3BrBer	4	31	1	12	21	24	Afra_A_wB31
	Brasil- Ilha Comprida (SP)	sp3BrIlc	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wB31
	Brasil-Jambeiro (SP)	sp3BrJam	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wB31
	Brasil-Pedro de Toledo (SP)	sp3BrPet	3	23	1	12	21	19	Afra_A_wB32
		sp3BrPet	2	646	1	12	21	280	Afra_A_wB33
	Brasil-Peruíbe (SP)	sp3BrPer	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wB31
	Brasil-Salesópolis (SP)	sp3BrSal	4	31	1	12	21	24	Afra_A_wB31
		sp3BrSal	1	647	1	12	21	281	Afra_A_wB34
	Brasil-São Luís do Paraitinga (SP)	sp3BrSlp	4	31	1	12	21	24	Afra_A_wB31
	Brasil-Taubaté (SP)	sp3BrTau	2	31	1	12	21	24	Afra_A_wB31
	Brasil-Ubatuba (SP)	sp3BrUba	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wB31
	Brasil-Caiobá (PR)	sp3BrCai	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wB31
	Brasil-Guaratuba (PR)	sp3BrGut	5	648	220	12	21	24	Afra_A_wB35
Brasil-Rio Negrinho (SC)	sp3BrRne	5	649	1	256	21	24	Afra_A_wB36	
A. sp.4	Equador-Guayaquil	sp4EqGuy	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wE41
A. fraterculus s.l.	Mexico-Apazapan	fraMxApa	4	650	1	12	21	282	Afra_A_wMx1
		fraMxApa	1	651	1	12	257	283	Afra_A_wMx2
	Mexico-Chiapas	fraMxChi	2	31	1	12	21	24	Afra_A_wMx3
		fraMxChi	1	652	221	12	21	284	Afra_A_wMx4
	Mexico-Jicayna	fraMxJic	4	653	222	257	21	285	Afra_A_wMx5
	Mexico-Quitana Roo	fraMxQur	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wMx3
	Mexico-Tapachula	fraMxTap	3	31	1	12	21	24	Afra_A_wMx3
		fraMxTap	2	654	223	258	21	286	Afra_A_wMx6
	Mexico-Teocelo	fraMxTeo	4	655	224	12	21	19	Afra_A_wMx7
	Guatemala-Guatemala City	fraGuGuc	3	31	1	12	21	24	Afra_A_wGu1
Colombia-	fraCoTol	3	31	1	12	21	24	Afra_A_wCo1	

	Tolima								
	Peru-La Molina	fraPeLmo	2	31	1	12	21	24	Afra_A_wPe1
	Peru-Piura	fraPePiu	2	31	1	12	21	24	Afra_A_wPe1
	Argentina-Concórdia	fraArCon	3	31	1	12	21	24	Afra_A_wAr1
	Argentina-Horco Molle	fraArHmo	5	31	1	12	21	24	Afra_A_wAr1
	Argentina-Tucumán	fraArTuc	2	31	1	12	21	24	Afra_A_wAr1
	Argentina-Misiones	fraArMis	2	656	225	12	21	19	Afra_A_wAr2
<i>A. obliqua</i>	Brasil-Bariri (SP)	oblBrBar	5	31	1	12	21	24	Aobl_A_wBo1
	Brasil-Botucatu (SP)	oblBrBot	5	31	1	12	21	24	Aobl_A_wBo1
	Brasil-Ilha Solteira (SP)	oblBrlls	2	31	1	12	21	24	Aobl_A_wBo1
	Brasil-Indaiatuba (SP)	oblBrInd	2	31	1	12	21	24	Aobl_A_wBo1
	Brasil-Mirassol (SP)	oblBrMir	3	657	1	12	21	287	Aobl_A_wBo2
	Brasil-Peruíbe (SP)	oblBrPer	2	31	1	12	21	24	Aobl_A_wBo1
	Brasil-Ribeirão Preto (SP)	oblBrRpr	5	31	1	12	21	24	Aobl_A_wBo1
	Brasil-Taubaté (SP)	oblBrTau	5	31	1	12	21	24	Aobl_A_wBo1
<i>Drosophila melanogaster</i>	Estados Unidos	melEu	1	31	1	12	21	24	Dmel_A_wMel
<i>Drosophila simulans</i>		simEu	1	16	11	13	15	14	Dsim_A_wRi
<i>Ephestia kuehniella</i>		kueEu	1	18	13	15	17	14	Ekue_A
<i>Drosophila bifasciata</i>		bifEu	1	11	9	9	12	9	Dbif_A
<i>Agelenopsis aperta</i>		apeEu	1	38	28	29	33	32	Aape_A_CDP21
<i>Agelenopsis utahana</i>		utaEu	1	39	29	30	32	31	Auta_A_UW21
<i>Agelenopsis longistyla</i>		lonEu	1	45	31	33	37	34	Alon_A_NG3
<i>Solenopsis invicta</i>		Argentina	invAr	1	28	21	21	25	21
<i>Aedes albopictus</i>	Tailândia	albTa	1	1	1	1	1	1	Aalb_A
<i>Drosophila orientacea</i>	Japão	oriJa	1	13	1	11	21	11	Dori_A
<i>Acraea encedon</i>	EUA	encEu	1	2	2	2	2	2	Aenc_B_Ugardan

As distâncias genéticas entre os haplótipos (Tabela XI) mostrou uma variação de 0.001 entre os haplótipos 31 (sp1Br: Ara, Bot, Ibi, Itr, Itr, Jac, Jam, Lor, Mir, Pir, Sal, Sis, Slp, Tri, Gua, Gum; sp2Br: Ber, Ilb, Ilc, Ite, Per, Sse, Tau, Uba, Par; sp3Br: Ber, Ilc, Jam, Per, Sal, Slp, Tau, Uba, Cai; sp4EqGuy; fraMx: Chi, Qur, Tap; fraGuGuc; fraCoTol; fraPe: Lmo, Piu; fraAr: Com, Hmo, Tuc; oblBr: Bar, Bot, Ils, Ind, Per, Rpr, Tau; melEu) e o haplótipo 23 (sp2Br: Pet, Uba, Gut; sp3BrPet) a 0,038, entre os haplótipos 642 (sp1BrSen) e 653 (fraMxJic). Entre as amostras de *Anastrepha* e das outras espécies, as distâncias foram maiores, variando de 0.055 (várias amostras) a 0,235 entre os haplótipos 654 (fraMxTap) e o haplótipo 45 (lonEu).

Tabela XI: Matriz de distância entre haplótipos das sequências dos genes *wsp*

Código	Haplótipo	31	23*	640	641	658	659	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	16	18	11	38	39	45	28	1					
sp1Br	23	.001																																		
sp1Br	640	.007	.007																																	
sp1Br	641	.005	.005	.012																																
sp1Br	658	.009	.009	.016	.014																															
sp1Br	659	.005	.005	.012	.009	.014																														
sp1Br	642	.009	.009	.016	.014	.019	.009																													
sp1Br	643	.005	.005	.012	.009	.014	.009	.014																												
sp2Br	644	.002	.002	.009	.007	.012	.007	.012	.002																											
sp2Br	645	.003	.002	.007	.005	.009	.005	.009	.005	.002																										
sp3Br	646	.003	.002	.007	.005	.009	.005	.009	.005	.002	.002																									
sp3Br	647	.002	.002	.007	.005	.009	.005	.009	.005	.002	.003	.003																								
sp3Br	648	.002	.002	.009	.007	.012	.007	.012	.007	.005	.002	.002	.002																							
sp3Br	649	.002	.002	.009	.007	.012	.007	.012	.007	.005	.002	.002	.002	.005																						
fraMx	650	.005	.005	.012	.009	.014	.009	.014	.005	.002	.005	.005	.005	.007	.007																					
fraMx	651	.002	.002	.009	.007	.012	.007	.012	.007	.005	.002	.002	.002	.005	.005	.007																				
fraMx	652	.007	.007	.014	.012	.016	.007	.012	.012	.009	.007	.007	.007	.009	.009	.012	.009																			
fraMx	653	.028	.028	.035	.033	.035	.033	.038	.033	.031	.028	.028	.028	.031	.031	.033	.031	.035																		
fraMx	654	.019	.019	.026	.023	.028	.023	.028	.023	.021	.019	.019	.019	.021	.021	.023	.021	.026	.035																	
fraMx	655	.002	.002	.009	.007	.012	.007	.012	.007	.005	.002	.002	.002	.005	.005	.007	.005	.009	.031	.021																
fraMx	656	.002	.002	.009	.007	.012	.007	.012	.007	.005	.002	.002	.002	.005	.005	.007	.005	.009	.031	.021	.005															
oblBr	657	.002	.002	.009	.007	.007	.012	.007	.012	.007	.005	.002	.002	.002	.005	.005	.005	.007	.005	.009	.031	.021	.005													
simEu	16	.091	.091	.099	.096	.101	.096	.099	.096	.093	.091	.091	.091	.093	.093	.096	.094	.099	.120	.109	.194	.197	.194													
kueEu	18	.163	.163	.172	.169	.174	.169	.172	.169	.166	.163	.163	.163	.166	.166	.169	.166	.172	.180	.180	.094	.093	.093	.091												
bifEu	11	.055	.055	.062	.060	.065	.060	.062	.060	.057	.055	.055	.055	.057	.057	.060	.058	.062	.085	.072	.166	.166	.166	.174	.166											
apeEu	38	.213	.213	.223	.220	.226	.220	.223	.220	.216	.213	.213	.213	.216	.216	.219	.217	.223	.229	.226	.058	.057	.057	.079	.150	.057										
utaEu	39	.188	.188	.197	.194	.200	.194	.197	.194	.191	.188	.188	.188	.191	.191	.194	.191	.197	.218	.206	.217	.216	.216	.254	.182	.227	.227									
lonEu	45	.204	.204	.214	.210	.216	.216	.211	.217	.210	.207	.204	.204	.204	.207	.207	.210	.208	.214	.235	.191	.191	.188	.188	.238	.192	.229	.192								
invAr	28	.060	.060	.068	.065	.070	.065	.068	.065	.063	.060	.060	.060	.063	.063	.065	.063	.068	.091	.080	.223	.208	.207	.204	.214	.252	.214	.261	.252							
albTa	1	.188	.188	.197	.194	.200	.194	.197	.194	.191	.188	.188	.188	.191	.191	.194	.191	.197	.218	.206	.063	.063	.063	.097	.153	.063	.246	.202	.218	.063						
orija	13	.055	.055	.062	.060	.065	.060	.062	.060	.057	.055	.055	.055	.057	.057	.060	.058	.062	.085	.072	.191	.191	.188	.188	.238	.192	.229	.192	.207	.204	.214					

31: sp1Br: Ara, Bot, Ibi, Itr, Itr, Jac, Jam, Lor, Mir, Pir, Sal, Sis, Slp, Tri, Gua, Gum; sp2Br: Ber, Ilb, Ilc, Ite, Per, Sse, Tau, Uba, Par; sp3Br: Ber, Ilc, Jam, Per, Sal, Slp, Tau, Uba, Cai; sp4EqGuy; fraMx: Chi, Qur, Tap; fraGuGuc; fraCoTol; fraPe: Lmo, Piu; fraAr: Com, Hmo, Tuc; oblBr: Bar, Bot, Ils, Ind, Per, Rpr, Tau; melEu. 23*: sp2Br: Pet, Uba, Gut; sp3BrPet.

O gene *wsp* é muito variável inclusive devido à ocorrência de recombinação intragênica frequente entre linhagens da *Wolbachia*, algumas pertencentes até a supergrupos distintos (Werren *et al.*, 1995; Werren & Windsor, 2000; Jiggins *et al.*, 2001; Werren & Bartos, 2001; Wu *et al.*, 2004; Baldo *et al.*, 2005). Embora não fosse objetivo do presente trabalho, as análises a seguir, como indicado em Material e Métodos, foram feitas na busca de evidências de recombinação entre os haplótipos encontrados em *Anastrepha*, segundo métodos utilizados por Baldo *et al.* (2007).

A Figura 8 mostra as sequências de aminoácidos dos polipeptídeos putativos alinhados com base na sequência da proteína de *D. melanogaster* (haplótipo 31). As sequências foram organizadas em grupos de acordo com a similaridade (identificados por cores diferentes), tomando-se a HVR1+ como base para o agrupamento. Por exemplo, na HVR1, as sequências de *Anastrepha* formam um grupo (motivo em amarelo) com pequenas diferenças entre elas, assim como as sequências 28, 39 e 2 (motivo em azul), as sequências 18 e 38 (motivo em lilás), enquanto as quatro sequências restantes, 683, 11, 16 e 45, ficam isoladas cada uma com um motivo distinto. Esse mesmo padrão de agrupamento de sequências com motivos similares, ocorre também nas outras três HVRs, mas sequências de cada grupo que apresentam motivos similares na HVR1 podem exibir motivos similares ou motivos distintos nas demais HVRs. Por exemplo, a sequência 18, que apresenta motivo similar à sequência 38 na HVR1, mostra-se distinta da sequência 38 nas HVR2 e HVR3 enquanto que na HVR4, apresenta motivo similar à sequência 16. Na Figura 7, vários outros exemplos podem ser vistos de sequências apresentando uma mistura de motivos presentes nas distintas HVRs de diferentes sequências. De acordo com Baldo *et al.* (2007), que observaram situação semelhante em outros artrópodes, o "embaralhamento" entre as HVRs resulta de processos de recombinação entre diferentes linhagens da *Wolbachia*.

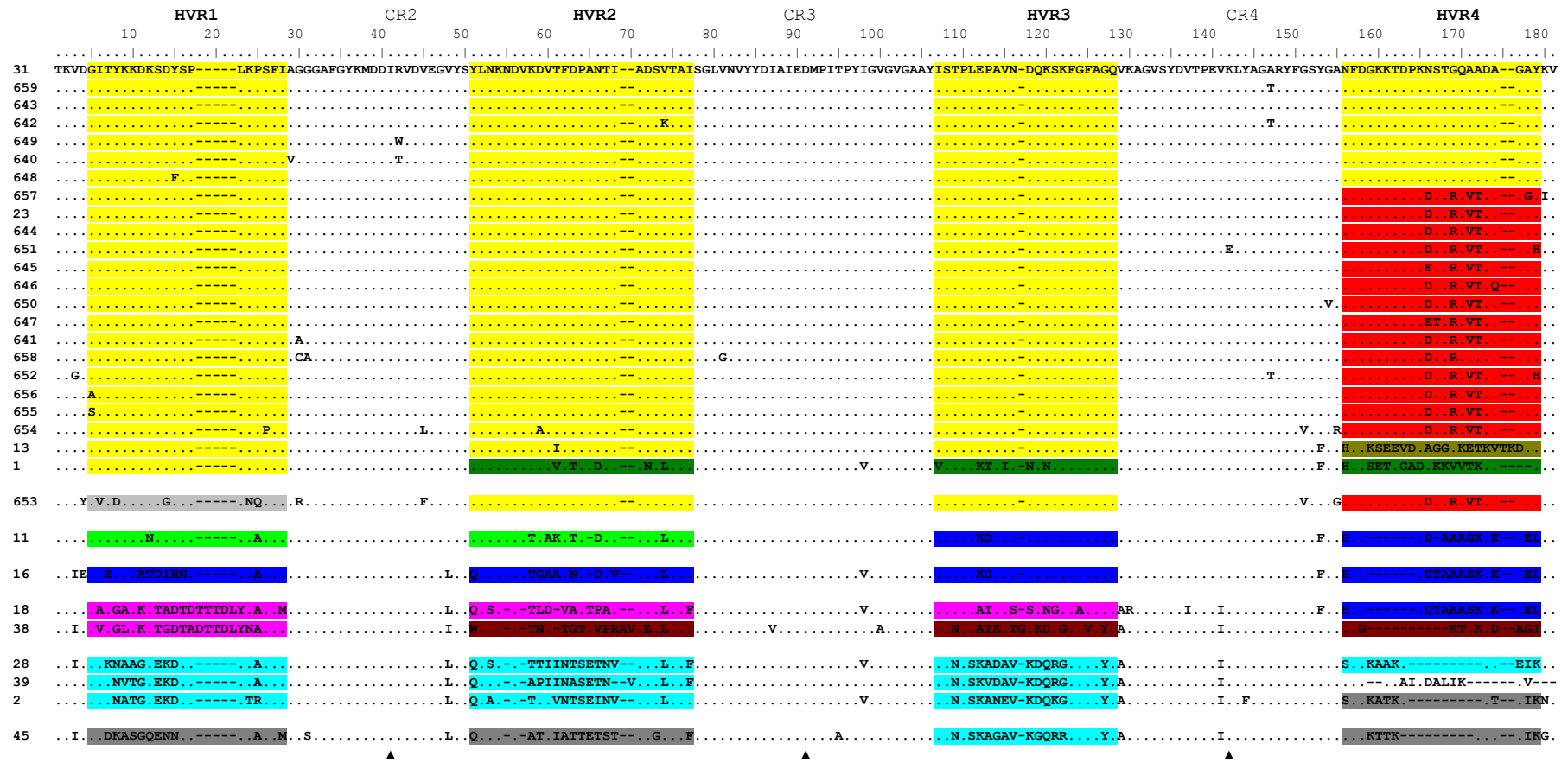


Figura 8: Alinhamento da seqüência de aminoácidos do gene *wsp*. A seqüência referência é a 31 (Afra_A: wB11, wB12, wB14, wB15, wB21, wB24, wB33, wB36, wE41, wMx3, wMx5, wGu1, wCo1, wPe1, wPe2, wAr1, wAr2, wAr3, Aobl_A_wBo1, Dmel_A_wMel). Motivos de aminoácidos nos HVRs são codificados pela cor, com base na similaridade de polimorfismos comuns dentro de cada HVR. O HVR1 é usado como a região de referência inicial para o agrupamento das seqüências.

A segunda análise indicando a possível existência de recombinação entre linhagens de *Wolbachia* que infectam *Anastrepha* foi feita pela análise filogenética das sequências de nucleotídeos do conjunto dos haplótipos, mas considerando cada HVR e parte das CRs (HVR+) isoladamente, como mostra a Figura 9. As quatro árvores geradas pelo método da parcimônia, mostram alto suporte estatístico e claramente, que as relações evolutivas entre os 22 haplótipos variam consideravelmente entre as quatro regiões do gene. Podem-se avaliar as relações evolutivas entre as sequências em cada motivo (subgrupos terminais nas árvores) e também, que existe um "embaralhamento" dessas relações entre as HVRs, pois determinadas sequências presentes em um determinado clado em uma HVR, encontram-se associadas à sequências diferentes em outros cladros. Tomando-se alguns exemplos, na árvore da HVR1+ (Figura 8), pode-se observar a formação de alguns subgrupos, um com as linhagens 28 (invAr) e 45 (lonEu) (vermelho), outro pelos haplótipos 653 (fraMxJic), 18 (kueEu) e 38 (apeEu) (verde claro). Na árvore da HVR2+, as linhagens 45 e 28 se separam (vermelho), o mesmo ocorrendo com a linhagem 653 que se separa dos haplótipos 18 e 38, que permanecem juntos. Na árvore da HVR3+, observa-se que os haplótipos 28 e 45 ficam próximos (vermelho) e os haplótipos 8, 38 e 653 ficam separadas (verde), enquanto que na árvore da região HVR4+, observa-se a separação das linhagens similares 28 e 45 (vermelho); o mesmo ocorrendo com as 18, 38 e 653 (verde). É provável que este embaralhamento, assim como o visto aquele detectado nas sequências de aminoácidos, deva-se, segundo Baldo *et al.* (2007), à processos de recombinação entre linhagens distintas da *Wolbachia*.

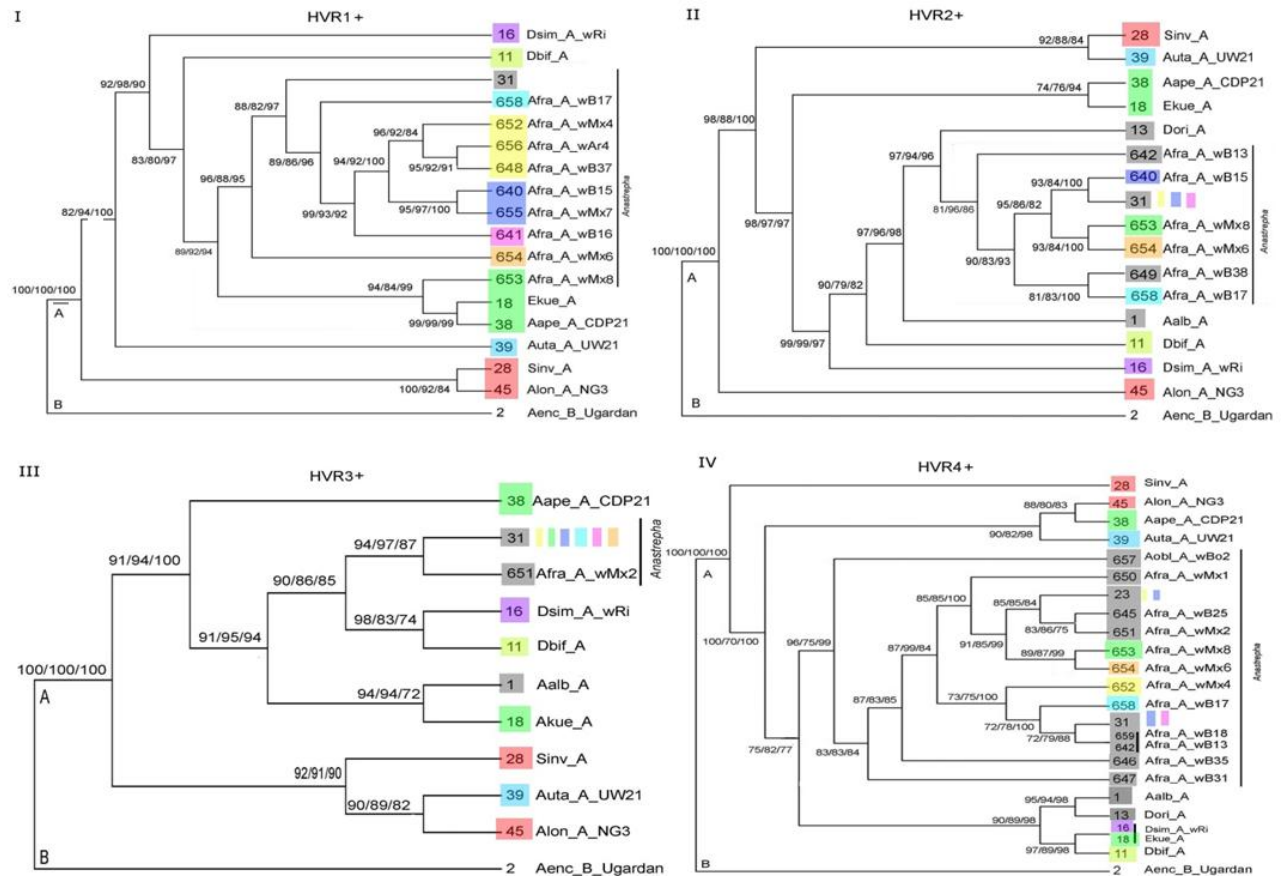


Figura 9. Árvores filogenéticas das quatro regiões do *wsp* abrangendo HVR+. Cores destacam os exemplos discutidos no texto (ver Resultados) e mostram mudanças na filogenia através das diferentes regiões *wsp*.

A análise de recombinação pelo método do MAXCHI evidenciou a existência de possíveis eventos entre os haplótipos estudados neste trabalho, mas também não encontrou uma das sequências parentais para todos os casos, como mostra alguns exemplos da Figura 10.

```

31 CCCAGGTGGAGTTATACCAAACAAGATGTTAAAGATGTTAGTGTAGTCAATAT
30 T.T..A...GC.C.C.ATGGCT.G-----.C.....C.

31 AAACATTGTATCTTGGAAACCCGCTG---TGAATGACAAAA
2 .....CA..CA.CAA.GGTT.A..CAG.T..G....GGG

653 ATAAGAAAGACA-GAGTGGTTACAGTCCGTAACCAATACTCGTGGTATCCCCAGG G.GC
16 ...A..G.C.CA..CA-T.C.T.A...A...AGC.....G.....

31 CATTTGACCAGCAAATACTATAGCAGTAAATATGGAAACATTGTATCTTGGAAACCCGCTG---
39 T.AA..CGTT.AG.CA.A.G.....T..TG...TT.....CA..CA.CAA.GGTT.A..CAG

31 ATTAGTGTAGTCAATATGGAAAAAACAGATCCTAAAAATTC---AACCGGACAGGCTGCTGATGCAGGCGCATACAAAT
39 .....C..-----..G....C.ATA...G..G.CCT..T.AA.-----GG..

1 GTTGTGGATACCTATAAGAAAGACA-GAGTGATTACAGTCCATAAACCTACTGGTGGT
39 .....AA..GTA.C..G..A..AA-.GG.T.....C....G.....

```

Figura 10. Exemplos de possíveis recombinantes do gene *wsp* determinados pelo programa MAXCHI. Em cada alinhamento estão mostrados apenas os sítios polimórficos e somente dois haplótipos, um dos quais seria o recombinante e o outro, um dos parentais. O segundo parental não foi encontrado pela presente análise. As regiões marcadas mostram o compartilhamento entre os haplótipos.

A inspeção visual dos padrões de motivos nas HVRs e alterações nas relações filogenéticas, assim como a análise pelo MAXCHI, não permitiram determinar com segurança os possíveis eventos de recombinação, pois para tanto, seria necessário determinar quais as sequências recombinantes e as duas parentais. Como para as espécies de *Anastrepha* estudadas uma grande parte das sequências são únicas, não é possível encontrar-se as duas sequências parentais. Para as demais, um maior número de sequências do Gene Bank deveria ser examinado, o que, entretanto, não era o objetivo do presente trabalho.

4. Comparação entre as filogenias do MLST (genes concatenados) e do gene *wsp*

Em diversos estudos, a análise das relações filogenéticas entre linhagens de *Wolbachia* foi feita utilizando-se a sequência completa do gene *wsp*. Assim, para efeito

de possíveis comparações, no presente estudo uma análise filogenética foi feita de modo similar. Nessa análise, foram geradas árvores pelos métodos da máxima verossimilhança, "Neighbor joining" e máxima parcimônia, que apresentaram topologias similares e alto suporte de *bootstrap*. Assim, foi escolhida a árvore gerada pela máxima parcimônia para representar as relações filogenéticas entre os haplótipos da *Wolbachia* (Figura 11, *wsp*). Os haplótipos 28 (invAr), mais basal, 39 (utaEu) e 45 (lonEu) ficam próximos, formando um ramo distinto. O haplótipo 38 (apeEu) forma um ramo distinto. Outro ramo é formado pelo haplótipo 18 (kueEu). O haplótipo 16 (simEu) forma um ramo distinto, assim como os haplótipos 11 (bifEu), 1 (albTa) e 13 (oriJa). Assim como nas filogenias anteriores, as linhagens de *Wolbachia* do gene *wsp* encontradas em *Anastrepha* formam um clado distinto, no qual vemos o haplótipo 646 (sp3BrPet) formar um ramo mais basal e os haplotipos 651 (fraMxApa) e 652 (fraMxChi) ficaram próximos, formando um ramo distinto. Outro grupo "interno" é formado pelos haplótipos 641(sp1BrUbe), mais basal; 657 (oblBrMir); 23 (sp2Br: Pet; Uba; Gut; sp3BrPet); 658 (sp1BrImb) e 653 (fraMxJic) e 654 (fraMxTap) próximos. Outro grupo "interno" é formado pelos haplótipos 656 (fraArMis), mais basal; 655 (fraMxTeo) formando um ramo e 645 (sp2BrCai) e 647 (sp3BrSal) próximos. Os haplótipos 644 (sp2BrPet) e 650 (fraMxApa) ficaram próximos, formando um ramo distinto. Outro grupo "interno" é formado pelos haplótipos 643 (sp1BrRne), que forma um ramo mais basal. Os haplótipos 642 (sp1BrSen) e 659 (sp1BrIra) ficaram próximos, formando um ramo distinto. Outro ramo é formado pelos haplótipos 31 (sp1Br: Ara, Bot, Ibi, Itr, Itr, Jac, Jam, Lor, Mir, Pir, Sal, Sis, Slp, Tri, Gua, Gum; sp2Br: Ber, Ilb, Ilc, Ite, Per, Sse, Tau, Uba, Par; sp3Br: Ber, Ilc, Jam, Per, Sal, Slp, Tau, Uba, Cai; sp4EqGuy; fraMx: Chi, Qur, Tap; fraGuGuc; fraCoTol; fraPe: Lmo, Piu; fraAr: Com, Hmo, Tuc; oblBr: Bar, Bot, IIs, Ind, Per, Rpr, Tau; melEu) e 640 (sp1BrIta). Outro ramo é formado pelos haplótipos 648 (sp3BrGut) e 649 (sp3BrRne).

A Figura 11 mostra uma comparação entre as árvores geradas pelos genes concatenados do MLST e pelo gene *wsp*. Na árvore do MLST, é possível observar oito cladogramas (identificados pelas cores): um com os haplótipos 2, 29, 65 e 75 (lilás); outro, com os haplótipos 12, 34, 73 (azul claro); em um terceiro os haplótipos 334, 343 e 344 (azul escuro); no quarto, um grupo formado pelos haplótipos encontrados no México: 335, 336, 337, 338 e 346 (cinza claro); o quinto grupo é formado pelos haplótipos 13, 331 e 332 (cinza escuro); o sexto, pelos haplótipos 330, 333 e 339 (vermelho); o sétimo pelos haplótipos 1, 329 e 345 (amarelo); o oitavo, pelos haplótipos 341 e 342 (verde) e os haplótipos 17, 19 e 340 que formaram ramos distintos.

Em contraste com o MST, a árvore formada pelo gene *wsp*, não suporta os grupos formados, inclusive mostrando que os haplótipos que tinham sequências similares ao ST-1 do MLST, separam-se em diversos ramos distintos (Figura 11, *wsp*).

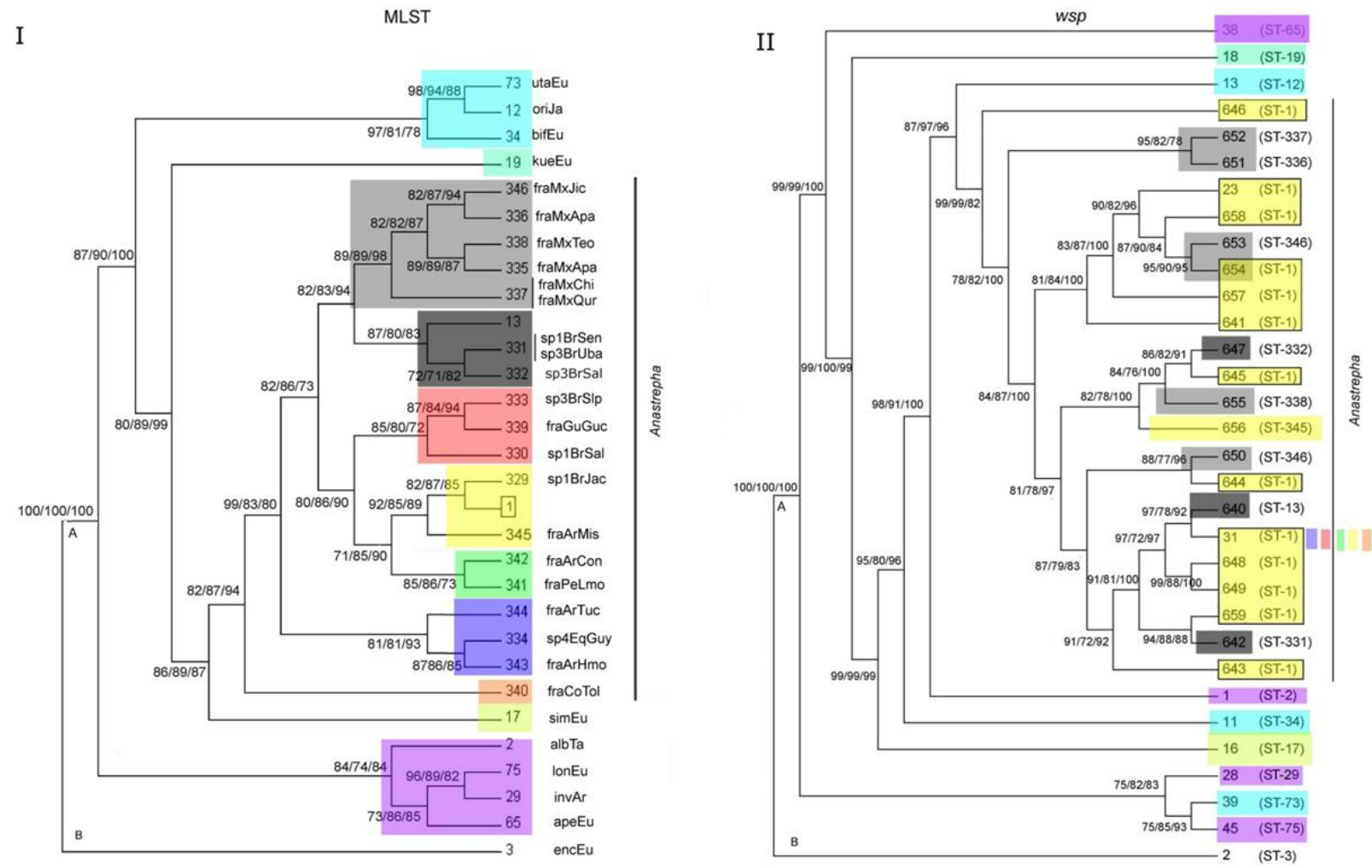


Figura 11: Esquerda: Árvore baseada nos cinco genes concatenados que formam o MLST. Direita: árvore baseada no gene *wsp*. Colorido: grupos formados na árvore do MLST e no *wsp*.

5. Análise de efeitos da *Wolbachia* em *A. sp.1* e em *A. obliqua*

Morfologia dos ovários. Foram estudadas fêmeas infectadas (N = 16) e curadas (N= 16) de *A. sp. 1* e infectadas (N=15) e curadas (N=11) de *A. obliqua*, que foram agrupadas em três categorias de acordo com o desenvolvimento dos ovários: estágio precoce, onde os ovaríolos continham folículos muito jovens; um segundo estágio, mais adiantado, com folículos já com células nutridoras bem visíveis (Figura 12) e um último estágio, no qual já existiam ovos maduros. A análise das preparações coradas pelo DAPI, mostrou que não haviam diferenças visíveis, entre os ovários de fêmeas infectadas e das curadas, nesta análise morfológica. Foram observadas pequenas má formações, p. exemplo, distribuição irregular de células foliculares, núcleos picnóticos (Figura 12), mas estas ocorreram com frequência muito baixa e tanto em fêmeas infectadas, como nas não infectadas, de ambas as espécies de hospedeiros.

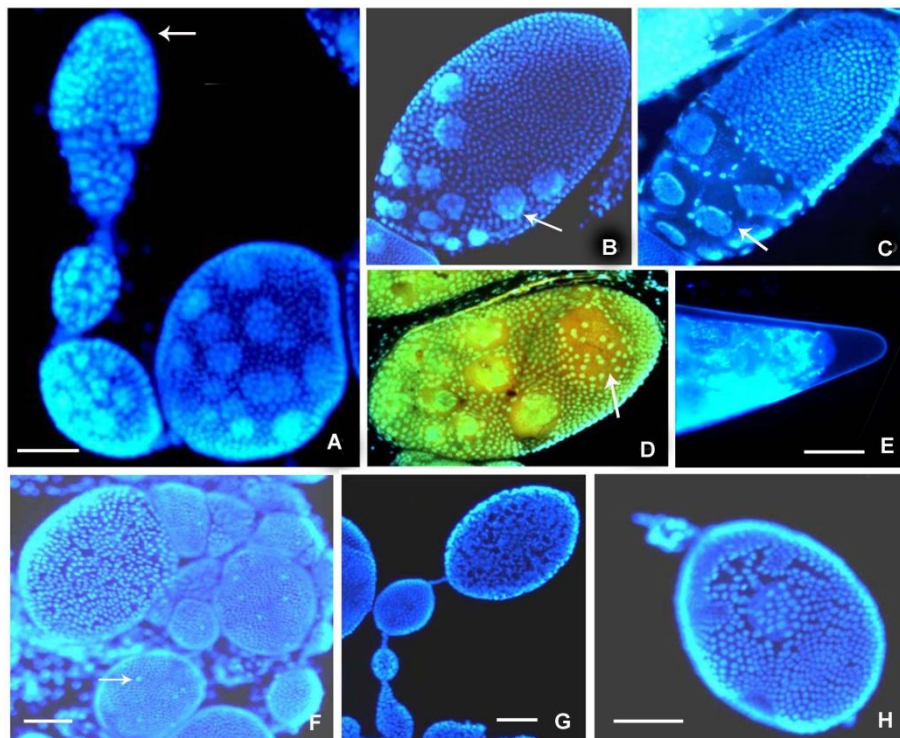


Figura 12: Exemplos de folículos ovarianos de *Anastrepha* em diferentes estágios de desenvolvimento (A-D), que são idênticos em *A. sp.1* e *A. obliqua*, infectados ou curados. A-C, corados pelo DAPI e D, corado pela acridina alaranjada (AO). (A) Extremidade distal do folículo onde se situam as ovogônias; (B,C,D) Estágios onde se notam as células nutridoras (setas) e a região do oócito (D, corado em avermelhado pela AO, seta). (E) Extremidade posterior de um ovo em um folículo, corado pelo DAPI, mostrando as bactérias infectantes (pontos brilhantes); (F-H) Folículos contendo aparente má formações: irregularidades na disposição das células foliculares (F,G,H) e também a presença de núcleos picnóticos (F, setas). Barra em A = 100 μ m e é válida para todas as figuras; (B,C,D) mesma escala que em A.

Produção de espermatozoides: Amostras de 4 a 10 machos infectados e igual número de machos curados de cada espécie de hospedeiros, foram coletadas em dias

alternados após a emergência das imago. A produção de espermatozoides em cada coleta (dias) de cada tratamento (infectados e curados) foi estimada pela contagem de cistos em determinado estágio da espermiogênese nessas amostras, estando os valores médios mostrados na Figura 13. Nota-se, que a produção de espermatozoides aumenta progressivamente após a emergência, atingindo um máximo em torno do dia 12 a.e. (após a emergência) em *A. sp.1* e no dia 20 a.e. em *A. obliqua*, decrescendo nos dias seguintes. Uma análise de variância com 2-parâmetros (dias vs. tratamento, Tabelas XII), mostrou que as diferenças foram significativas ao longo do tempo, mas que as diferenças entre indivíduos infectados e curados não foram significativas em ambas às espécies de hospedeiros.

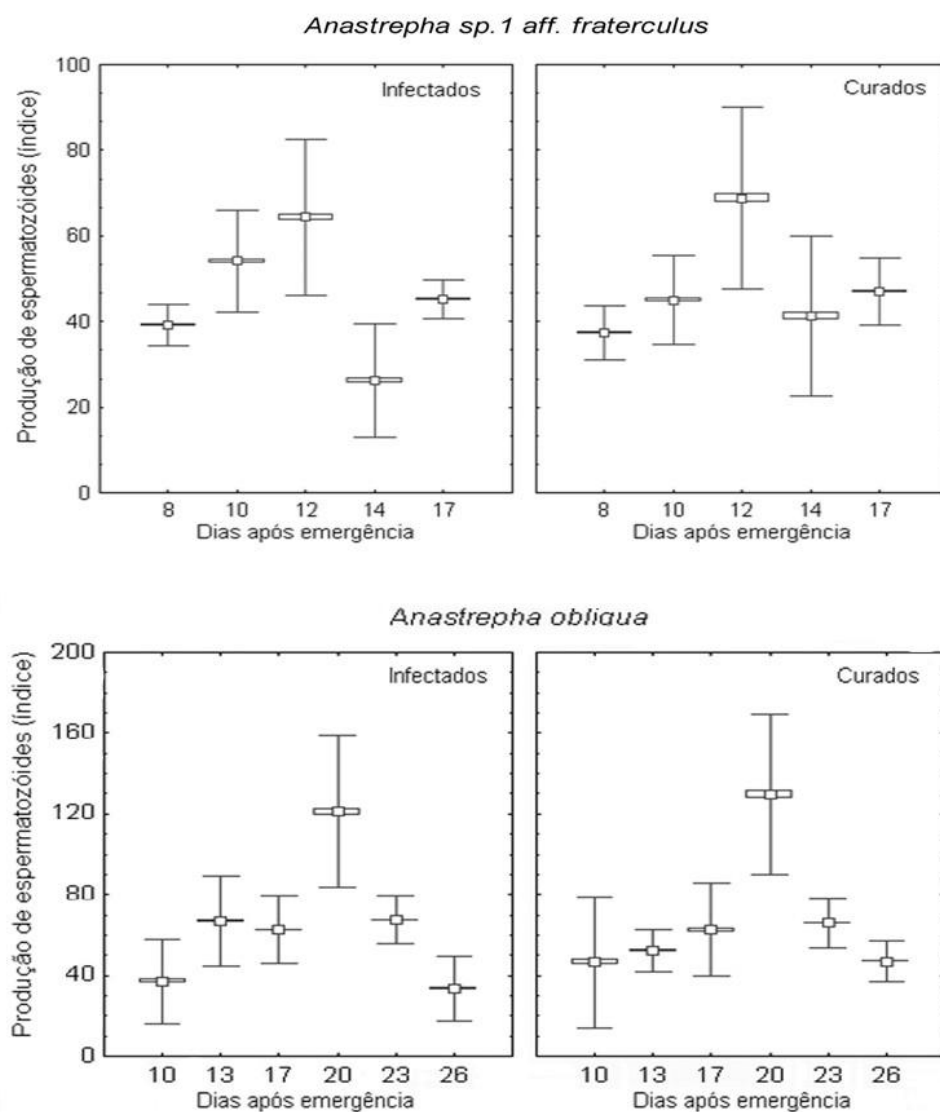


Figura 13: Produção e espermatozoides e dias após a emergência de indivíduos de *A. sp.1* e *A. obliqua* infectados e curados.

Tabela XII. Análise de variância da produção de espermatozoides em *A. sp.1* e *A. obliqua*

A. <i>Anastrepha sp.1 aff. fraterculus</i>						
	Efeito	Efeito	Erro	Erro		
	gl	MS	gl	MS	F	P
Tratamento (Inf;Cur)	1	334,70	4	299,29	1,12	0,350
Dias	4	1970,20	4	299,29	6,58	0,047*
Trat x Dias	4	299,30	37	275,53	1,09	0,377
B. <i>Anastrepha obliqua</i>						
Tratamento (Inf;Cur)	1	106,5	5	287,7	0,37	0,5695
Dias	5	9111,61	5	287,7	31,67	0,0009**
Trat x Dias	5	287,7	57	625,74	0,46	0,8045

Fecundidade: Esta análise envolveu cruzamentos entre machos e fêmeas infectados tirados das colônias de cada espécie e cruzamentos entre indivíduos não infectados, tirados da geração F1 das colônias respectivas. Para cada espécie, foram feitos quatro tipos de cruzamentos: (1) entre machos e fêmeas infectados; (2) entre machos e fêmeas não infectados; (3) entre fêmeas infectadas e machos não infectados e (4) entre fêmeas não infectadas e machos infectados. Para cada tipo de cruzamentos, foram obtidas entre 11 e 15 amostras, coletadas em dias alternados durante aproximadamente um mês.

Nos cruzamentos de *A. sp.1* infectados (1), foi obtido um total de 1.020 ovos, enquanto que nos cruzamentos de moscas curadas (2), obteve-se 349 ovos. Nos cruzamentos de fêmeas infectadas com machos curados (3), obteve-se 379 ovos e nos cruzamentos recíprocos (4), obteve-se 292 ovos. O teste de Kruskal-Wallis mostrou diferenças significativas ($KW = 23,45$; $P < 0,001$) (Figura 14A). Pode-se comparar a produção de ovos entre as fêmeas infectadas e não infectadas pelos resultados dos cruzamentos 1+3 (infectadas) e 2+4 (não infectadas). O teste de Mann-Whitney mostrou que as primeiras produzem mais ovos que as segundas ($U=97,0$, $U'=387,0$; $P=0,0007$).

Nos cruzamentos de *A. obliqua* infectadas (1), foi obtido um total de 800 ovos, enquanto que nos cruzamentos com indivíduos curados (2), obteve-se 672 ovos, nos cruzamentos entre fêmeas infectadas com machos curados (3) obteve-se 382 ovos e nos cruzamentos recíprocos (4), obteve-se 207 ovos. O teste de Kruskal-Wallis mostrou diferenças significativas ($KW = 14,55$; $P=0,0022$) (Figura 14B). Em *A. obliqua*, as fêmeas infectadas (cruzamentos 1+3) e as não infectadas (cruzamentos 2+4), produzem quantidade de ovos que não diferem estatisticamente entre elas, como mostra o teste estatístico de Mann-Whitney ($U=230,5$, $U'=363,5$; $P=0,1846$).

Fertilidade: A taxa de eclosão dos ovos nos cruzamentos de indivíduos de *A. sp1* infectados (1) foi de 87,4% (n=1020) e nos cruzamentos entre indivíduos não infectados (2), a taxa foi de 64,2 % (n=349). Quando fêmeas infectadas de *A. sp1* foram cruzadas com machos não infectados (3), a taxa de eclosão de ovos foi de 43,8% (n=379) e nos cruzamentos recíprocos (4), a taxa de eclosão dos ovos foi de 20,9% (n=292), Análise de variância, com os dados percentuais transformados em $\arcsen\sqrt{P}$, mostrou que as diferenças são significativas ($F = 39,06$; g.l.= 3, 40; $P < 0,001$) (Figura 14C). Nessa Figura, também está mostrado o valor do IC_{cor} que foi de 54,01%. Ignorando-se o cruzamento 4 (incompatível pela IC), os dados permitem estimar a influência dos machos nos cruzamentos. Assim, machos infectados produzem maior progênie (cruzamento 1) que os machos não infectados (cruzamento 3) quando são cruzados com fêmeas infectadas ($t = 5,716$; g.l.= 20; $P < 0,001$). Por outro lado, machos não infectados produzem maior progênie quando cruzados com fêmeas não infectadas (cruzamento 2) que os cruzados com fêmeas infectadas (cruzamento 3), embora a diferença esteja próxima do nível de significância ($t = 2,196$; g.l. = 20; $P = 0,04$).

Em *A. obliqua*, nos cruzamentos entre indivíduos infectados, a taxa de eclosão foi de 89,9% (n=800) e nos cruzamentos entre indivíduos não infectados, a taxa de eclosão foi de 60,6% (n=672). Nos cruzamentos entre fêmeas infectadas com machos não infectados, a taxa de eclosão foi de 56,3% (n=382) e nos cruzamentos recíprocos, a taxa de eclosão caiu para 24,6% (n=207). Análise de variância, com os dados percentuais transformados em $\arcsen\sqrt{P}$, mostrou que as diferenças entre os cruzamentos são significativas ($F = 18,82$; g.l. = 3, 42; $P < 0,001$). O índice de IC_{cor} foi de 66,2% (Figura 14D). Não considerando o cruzamento 4, que resulta em IC, pode-se notar que machos infectados produzem maior progênie (cruzamento 1) que machos não infectados (cruzamento 3), quando são cruzados com fêmeas infectadas ($t = 6,41$; g.l.= 25; $P < 0,001$). Machos não infectados produzem progênies similares quando cruzados com fêmeas infectadas (cruzamento 3) ou com fêmeas não infectadas (cruzamento 2) ($t = 1,59$; g.l. 23; $P = 0,126$).

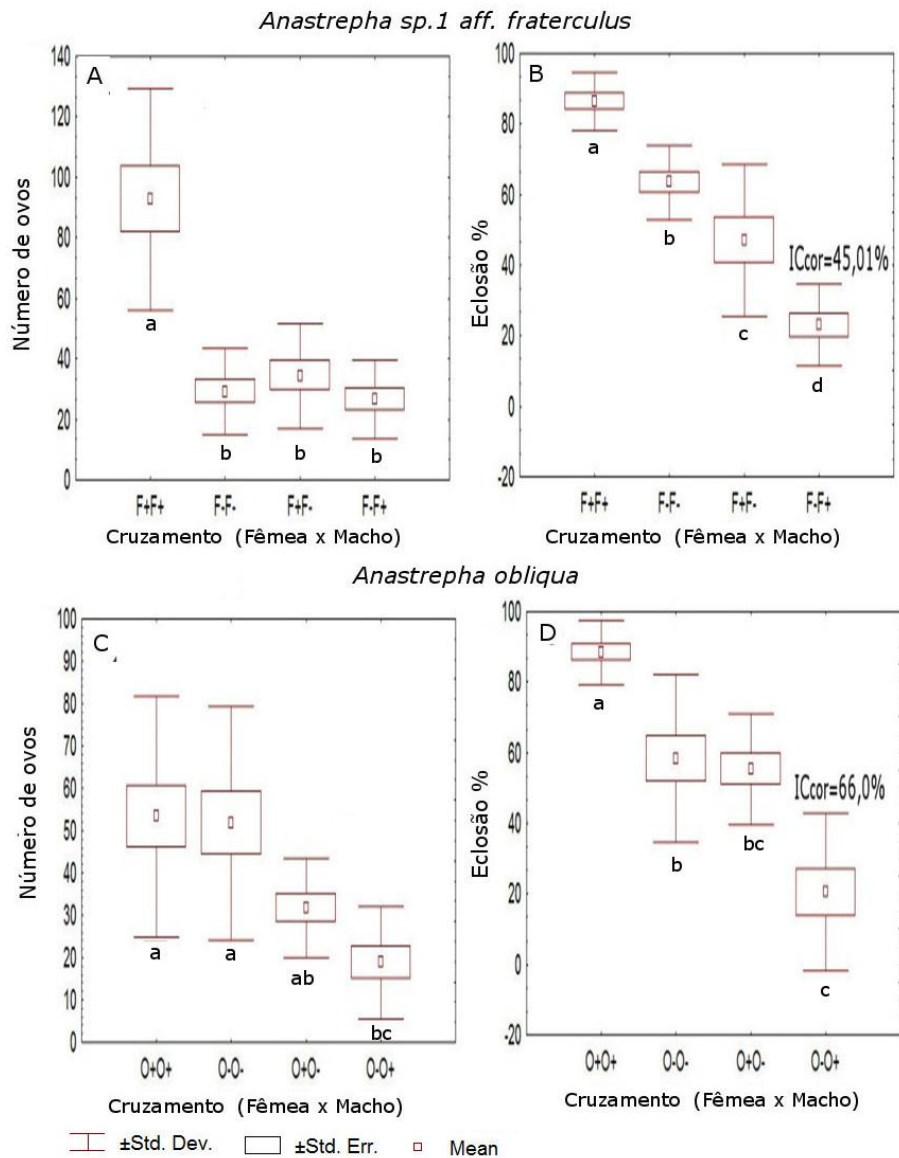


Figura 14. A: Número de ovos de *A. sp.1*. B: taxa de eclosão e IC_{cor} de *A. sp.1*. *Cruzamento com diferença significativa. C: Número de ovos de *A. obliqua*. D: taxa de eclosão e IC_{cor} de *A. obliqua*. Letras distintas indicam diferenças significativas. Sinais + e - indicam presença ou ausência de infecção.

Discussão

O estudo da *Wolbachia* intensificou-se nas últimas décadas particularmente pelo fato desse endossimbionte interferir e modificar o sistema reprodutivo em seus hospedeiros (Werren, 1997, 1998; Werren *et al.* 2008). No presente trabalho foi examinada a presença da *Wolbachia* em exemplares do complexo *Anastrepha fraterculus* de 37 localidades, do Brasil e de outras 14 áreas geográficas da Região Neotropical além de amostras de *A. obliqua* do Brasil. As localidades de origens das amostras foram escolhidas pela presença de distintos morfotipos do complexo *fraterculus*, como demonstrado por análise do marcador molecular ITS1 (Prezotto 2008) e pela análise morfométrica de características dos adultos (Hernández-Ortiz *et al.*, 2012). No presente trabalho, apenas quatro indivíduos encontrados em populações de diferentes localidades do México (Chiapas, Jicayna, Tapachula e Teocelo) e um da Argentina (Concórdia), não estavam infectados, representando apenas 1,7% do total de amostras estudadas (5 indivíduos não infectados em 292 estudados). Mascarenhas (2007) não encontrou infecção em uma amostra de *Anastrepha serpentina* de Natal (RN), porém a *Wolbachia* foi encontrada em indivíduos de uma população desta espécie em São Sebastião (SP). Recentemente, Martinez *et al.* (2012) encontraram populações de *Anastrepha ludens* do México sem a presença da bactéria. Além destes, os indivíduos de *Ceratitis capitata* da população de Mirassol não apresentaram infecção. Segundo Bourtzis *et al.* (1994) e Zabalou *et al.* (2004), a espécie *C. capitata* não seria infectada pela bactéria *Wolbachia*, embora Rocha *et al.* (2005) a tenham encontrado em uma amostra de população natural (São Bento do Sapucaí-SP) e em duas colônias de laboratório, uma de nosso laboratório e outra do Centro de Energia Nuclear na Agricultura-CENA/USP.

Em trabalhos prévios, a presença desta bactéria foi descrita em várias espécies de moscas-das-frutas da família Tephritidae e parasitoides a ela associados, tendo sido observado usualmente uma alta taxa de indivíduos infectados, entre 86% a 100% em diferentes amostras de *Anastrepha* (Mascarenhas, 2007; Coscrato *et al.*, 2009; Marcon, 2009) Esta alta taxa de infecção em *Anastrepha* é maior que a encontrada em diversos grupos de organismos (Werren *et al.*, 1995, West *et al.*, 1998; Werren & Windsor, 2000), em ácaros (Bremer & Jacobs, 1996), formigas (Wenseleers *et al.*, 1998), vespas (Schoenmaker *et al.*, 2002) e em *Pseudacton* (Diptera) (Dedeinet *et al.*, 2005). Por outro lado, Bennet *et al.* (2012) descreve altas taxas de infecção por *Wolbachia* em amostra de população de *Nesophrosyne craterigena* do Havaí (100%) e Narita *et al.* (2008) encontraram frequência de infecção alta (85,7 a 100%) em sete populações japonesas da borboleta *Colias erate poliographus*. No entanto, uma

análise recente, envolvendo um grande número de espécies de artrópodos terrestres e também um grande número de indivíduos examinados por espécie, mostrou que a taxa de infecção é de cerca de 40%, portanto, menor que as estimativas anteriores. Este mesmo trabalho, corroborando análises prévias, mostra que dentro de determinada espécie a maioria ou então, apenas alguns dos indivíduos estão infectados (Zug & Hammerstein, 2012). As espécies de *Anastrepha* aparentam ambas as condições, alta taxa de infecção por espécie e também dentro de cada população.

Em todas as amostras de *Anastrepha* infectadas, estudadas neste trabalho, a *Wolbachia* pertencia ao supergrupo "A". Estes dados são semelhantes aos obtidos por Mascarenhas (2007), Coscrato *et al.* (2009), Cáceres *et al.* (2009) e Marcon (2009) que também acharam cepas de *Wolbachia* pertencentes ao supergrupo "A" em diferentes espécies de *Anastrepha*, como em *A. sp.1*, *A. sp.2*, *A. sp.3*, *A. sp.4*, *A. fraterculus s.l.*, *A. amita*, *A. obliqua*, *A. sororcula*, *A. striata*, *A. serpentina*, *A. grandis*, *A. pickeli*, de diferentes regiões do Brasil, Argentina, Equador e Peru. Até o presente momento, apenas uma população *Anastrepha fraterculus s.l.*, em amostra de região desconhecida (Cáceres *et al.*, 2009) e duas amostras de *A. obliqua*, coletadas em Indaiatuba e Caçapava (SP) (Mascarenhas, 2007), apresentaram dupla infecção, com cepas do supergrupo "A" e cepas do supergrupo "B" de *Wolbachia*. Além disso, populações de *Anastrepha striata*, presentes no México, apresentaram infecção com *Wolbachia* do supergrupo "B" (Martinez *et al.*, 2012). Segundo Werren & Windsor (2000), podem haver diferenças na capacidade de bactérias dos supergrupos "A" e "B" em infectar diferentes grupos de hospedeiros. *Anastrepha*, de acordo com os dados obtidos, aparentemente seria mais propensa a ser infectada por *Wolbachia* do supergrupo "A".

Em algumas das amostras deste trabalho, duas espécies de hospedeiros derivaram do mesmo fruto, como *A. sp.2* e *A. sp.3* coletados em chapéu-de-sol (*Terminalia cattapa*) ou goiaba (*Psidium guajava*) em Bertioga, Ilha Comprida, Pedro de Toledo, Peruíbe, Ubatuba (SP) e Guaratuba (PR) e como *A. sp.1* e *A. sp.3* coletados em goiaba, nas localidades de Jambeiro, São Luís do Paraitinga (SP) e Rio Negrinho (SC). Nestes casos, as mesmas linhagens da bactéria *Wolbachia* (ST-1 e wsp-31 e wsp-23) foram encontradas infectando estes hospedeiros, Kittayapong *et al.* (2000) observaram que espécies de *Bactrocera* que emergiam de uma mesma amostra de frutos, estavam infectadas com a mesma linhagens de *Wolbachia*. O mesmo poderia ocorrer entre espécies que estão infestando o mesmo fruto, ocorrendo nesta situação, trocas de linhagens da bactéria entre estas espécies, fato este que poderia explicar a presença das linhagens semelhantes. Transmissão horizontal já foi

descrita em numerosas espécies de insetos (Werren & O'Neil, 1997; Vavre *et al.*, 1999) e também foi sugerida, anteriormente, na associação entre seis espécies de *Anastrepha* e cinco espécies de parasitóides braconídeos à elas associados, por apresentarem haplótipos idênticos de *Wolbachia* (Mascarenhas, 2007).

Analisando-se isoladamente os cinco genes que integram a metodologia do MLST nas diferentes entidades (morfortipos) do complexo *fraterculus* aqui estudadas, foram encontrados sete alelos para gene *gatB*, sendo cinco deles inéditos (um em comum a dois hospedeiros) e dois já descritos anteriormente, enquanto que para o gene *coxA* foram encontrados quatro alelos diferentes, sendo um já anteriormente descrito. Seis alelos foram encontrados no gene *hcpA* (quatro inéditos), nove no *ftsZ* (sete inéditos) e também nove alelos para o gene *fbpA* (oito inéditos). Em 42 espécies de outros hospedeiros, Baldo *et al.* (2006a) encontraram, respectivamente, 26, 27, 31, 28 e 25 alelos dos cinco genes. Assim, considerando-se os alelos desses genes, foram encontrados 34 variantes nas seis entidades do complexo (5,7 alelos/espécie), contra os 137 descritos por Baldo *et al.* (2006a) nas 42 espécies de outros insetos (3,7 alelos/espécie), dados que indicam que a variabilidade de linhagens de *Wolbachia* é alta em *Anastrepha*.

As inferências filogenéticas de cada um dos genes do MLST isoladamente demonstram que a utilização de um único gene não é suficiente para uma tipagem correta, dado o embaralhamento das posições relativas dos alelos dentro dos clados gerados para cada gene, além de que, o elevado nível de suporte para um clado, pode mascarar conflitos de locos únicos. Estes resultados estão de acordo com observações anteriores de Baldo *et al.* (2006ab) utilizando uma grande diversidade de espécies. Como esses autores demonstraram que parte desse embaralhamento é devido a uma alta taxa de recombinação intergênica apresentada pela *Wolbachia*, é provável que mecanismo similar esteja ocorrendo em *Anastrepha*.

A identificação dos alelos dos cinco genes mostrou que nas amostras do complexo *fraterculus* existiam 17 linhagens (ST, "strain types") inéditas e duas anteriormente descritas (ST-1 e ST-13). Por exemplo, Baldo *et al.* (2006a) encontraram 37 linhagens de *Wolbachia* em 42 espécies hospedeiras e Salunke *et al.* (2012) encontraram, na Índia, 13 novas linhagens de *Wolbachia* em 56 espécies de borboletas pertencentes a cinco diferentes famílias .

A filogenia gerada com os cinco genes concatenados, mostra que as linhagens encontradas em *Anastrepha* separam-se em um grande clado, distinto das linhagens de *Wolbachia* de outros hospedeiros. Além disso, demonstra que não há um

agrupamento de linhagens de acordo com as regiões geográficas de origem das amostras, embora alguns clados tenham frequência maior de amostras de uma mesma região, ou morfotipo do complexo. Os resultados mostram que a metodologia do MLST fornece um excelente método para caracterização das estirpes *Wolbachia* em *Anastrepha* e também, para a discriminação entre as cepas de uma mesma espécie de hospedeiro, assim como demonstrado por Baldo *et al.* (2006a) para outras linhagens de *Wolbachia* de outros hospedeiros.

No presente trabalho, para efeito comparativo, as amostras do complexo *fraterculus* tipificadas pelo MLST foram também estudadas utilizando-se o gene *wsp*, através da metodologia do "Wsp Typing", proposta por Baldo *et al.* (2005). Foram encontrados 22 linhagens diversas, sendo 20 inéditas e duas anteriormente descritas em outros hospedeiros. Baldo *et al.* (2006a), também utilizaram a técnica do *wsp*, encontrando as mesmas linhagens identificadas pelo MLST, com exceção de uma, que não foi amplificada pelo *wsp*. Assim como para o MLST, as linhagens encontradas em *Anastrepha* formam um clado distinto. Porém, nota-se que as relações inferidas por perfis MLST e *wsp*, não são necessariamente concordante, mas complementares, resultados semelhantes aos de Baldo *et al.* (2006a).

No presente trabalho, embora tenha sido encontrado maior número de alelos utilizando o sequenciamento do gene *wsp*, a filogenia formada com os genes concatenados do MLST parece ser mais consistente ao formar os clados. Por exemplo, forma o clado "mexicano", que agrupa as linhagens encontradas nos hospedeiros de amostras populacionais do México, enquanto que na filogenia baseada somente no *wsp*, estas linhagens estão separadas. A filogenia do *wsp*, com base no conjunto de dados de uma mesma linhagem, não suporta a monofilia dos clados formados pelo MLST, fato semelhante foi observado por Baldo & Werren (2007). Estes aspectos, referentes ao gene *wsp*, são devidos ao fato desse gene ser muito variável quanto a substituição de nucleotídeos e também, por apresentarem altas taxas de recombinação intragênica (Baldo *et al.*, 2010).

No presente trabalho, encontramos evidências de recombinação no gene *wsp* em, pelo menos, 17 indivíduos do complexo *fraterculus*. A região HVR1 mostra pouca divergência entre os grupos, porém a HVR4 apresenta alta divergência, possivelmente devido ao resultado de recombinações. Entretanto, quando os métodos filogenéticos foram aplicados a este conjunto de dados, uma assinatura de recombinação na HVR4 foi mascarada por um elevado grau de semelhança entre as primeiras três HVRs, assim como ocorre em outros organismos infectados pela *Wolbachia* (Baldo *et al.*,

2006a). Desta forma, os dados apresentados no presente trabalho, corroboram a crítica feita por Baldo & Werren (2007) sobre filogenias baseadas somente no gene *wsp* de *Wolbachia*. Segundo esses autores, muitos dos haplótipos isolados pelo estudo do *wsp* não representam haplótipos ou linhagens novas ou únicas e sim, são haplótipos produtos da recombinação entre haplótipos existentes naquele hospedeiro. Propõe que é necessária a utilização da metodologia do MLST, que se baseia não apenas em um, mas em cinco genes do ciclo celular bacteriano, para identificar com segurança as linhagens da *Wolbachia*. Por outro lado, a ocorrência de duas ou mais linhagens da bactéria em um mesmo hospedeiro existentes em uma mesma localidade, favoreceria a transferência horizontal e, portanto, uma possibilidade de recombinação entre as linhagens, como mostrou Yang *et al.* (2012) para uma comunidade da vespa do figo.

Além das modificações reprodutivas induzidas pelas *Wolbachia*, outros efeitos nas relações adaptativas entre essas bactérias e seus hospedeiros são conhecidas (rev. Werren *et al.* 2008). Dedeine *et al.* (2003) encontraram redução no desempenho reprodutivo das fêmeas de vespas, sugerindo um efeito das bactérias no valor adaptativo do hospedeiro. Análises de algumas possíveis relações da *Wolbachia* com um de seus hospedeiros do complexo *fraterculus*, *A. sp.1*, e com *A. obliqua*, ambas pertencentes ao grupo *fraterculus*, foram também realizados no presente trabalho. Para tanto, foi necessário o estabelecimento de colônias isentas de *Wolbachia*, pois não foram encontradas populações não infectadas de ambas as espécies. A eliminação da bactéria foi feita por tratamento térmico a 30°C (Werren, 1997; Boutzis & O'Neill, 1998), pois, segundo Ribeiro (2008), foi o método mais adequado para eliminação das bactérias encontradas nestas espécies.

A análise da fecundidade de fêmeas infectadas em comparação com a de fêmeas não infectadas, quando cruzadas com machos infectados ou não infectados, mostrou que em *A. sp.1* houve uma queda no número de ovos botados quando as bactérias foram eliminadas, mas que em *A. obliqua* não houve diferenças entre a fecundidade das duas condições das fêmeas. Em várias situações, a ausência da *Wolbachia* causa uma degeneração dos ovários, p. exemplo em *Drosophila* (Miller *et al.*, 2012), na vespa *Asobara tabita* (Pannebaker *et al.*, 2007), o que não foi observado nos ovários de *Anastrepha* isentas da bactéria.

Além das alterações impostas pela *Wolbachia* na fecundidade das fêmeas, a fertilidade também pode ser afetada, por exemplo, via a incompatibilidade citoplasmática (Werren *et al.* 2008, entre outros). Os resultados dos cruzamentos

intraespecíficos, nos quais se verificou a redução na taxa de eclosão quando fêmeas curadas eram cruzadas com machos infectados, mostram a existência de IC mediada pela *Wolbachia*, corroborando resultados anteriores encontrados por Ribeiro (2008). Os dados do presente trabalho, mostram que a expressão da incompatibilidade é significativa em *Anastrepha*, atingindo altas taxas em comparação com outros sistemas descritos (Poinsot *et al.*, 1998; Werren 1997; Dobson, 2003; Bourtzis *et al.*, 2003), inclusive em outros gêneros de moscas-das-frutas, como em *Rhagoletis cerasi* (Riegler & Stauffer, 2002), na qual foram encontradas duas linhagens distintas de *Wolbachia* (IC bidirecional) e em *Ceratitis capitata* (Zabalou *et al.*, 2004). Além da fertilidade dos ovos, a *Wolbachia* também pode afetar o desempenho dos machos. Machos infectados, de ambas as espécies de *Anastrepha* ora estudadas, estão associados às maiores taxas de eclosão dos ovos (maiores progênies) do que os machos não infectados, quando ambos são cruzados com fêmeas infectadas. No entanto, esse melhor desempenho dos machos infectados em *Anastrepha*, parece não ser devido a maior número de espermatozoides produzidos, contrário ao descrito em *Drosophila*, onde os machos não infectados produzem menor número de espermatozóides (Snook *et al.*, 2000). Por outro lado, machos não infectados de *A. obliqua* produzem progênies similares quando cruzados com fêmeas infectadas ou com fêmeas não infectadas, enquanto que machos não infectados de *A. sp.1* produzem progênies ligeiramente maiores quando cruzados com fêmeas não infectadas. As causas do melhor desempenho dos machos infectados de *Anastrepha* permanecem desconhecidas.

A habilidade da bactéria *Wolbachia* de causar Incompatibilidade Citoplasmática (IC) em artrópodes tem gerado interesses em seu uso como mecanismo de controle de pragas, em substituição à Técnica do Inseto Estéril (Bourtzis, 2008; Werren *et al.*, 2008). A Técnica do Inseto Incompatível (TII), na qual são introduzidos machos infectados com cepas de *Wolbachia* diferentes das encontradas em determinada região, tem sido desenvolvida como um mecanismo de controle populacional por indução a IC (Dobson *et al.*, 2002; Zabalou, 2004; Xi *et al.*, 2005) A técnica do TII tem amplas possibilidades de ser utilizada para controlar população de *Culex quinquefasciatus* em ilhas do Oceano Índico (Atyame *et al.*, 2011). Zabalou *et al.* (2004; 2009) observaram a IC em *Ceratitis capitata* infectadas artificialmente, tendo grande potencial no uso da TII. O presente trabalho, ao demonstrar a existência de diferentes linhagens de *Wolbachia* em diferentes espécies e áreas geográficas do complexo *fraterculus* e também, a existência de IC ocorre com altas taxas, indica a possibilidade de aplicações da TII no manejo e controle desses insetos-praga.

Os resultados deste trabalho sugerem que a *Wolbachia* interage diferentemente com *A. sp.1* e com *A. obliqua*, como evidenciado pela fecundidade das fêmeas, pela maior efetividade de machos infectados e pelas valores de IC induzidas, de modo similar ao observado em outros insetos (p. ex., Poinso *et al.* 1998; Clark *et al.*, 2003; Zabalou *et al.*, 2004). A *Wolbachia* apresenta, usualmente, uma relação parasítica com seus hospedeiros (rev. Werren *et al.* 2008). No entanto, são conhecidos casos onde a presença da *Wolbachia* provê benefícios adaptativos aos seus hospedeiros, p. exemplo, em *Drosophila paulistorum* (Miller *et al.*, 2010), em *D. simulans* (Weeks *et al.*, 2007), *D. melanogaster* (Koukou *et al.*, 2006; Sun & Cline, 2009), em *Drosophila spp.* (Peng *et al.*, 2008) e no microhimenópero *Asobara tabita* (Pannebaker *et al.*, 2007). Nesses casos, a relação da *Wolbachia* com seus hospedeiros evoluiu de parasitismo para um mutualismo incipiente ou até mesmo obrigatório, como em *A. tabita*. Esta transição é concebida em situações de longa associação entre a bactéria e seu hospedeiro (Werren, 1997, 1998; Werren *et al.* 2008). Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que exista uma condição de mutualismo entre a *Wolbachia* e o hospedeiro *Anastrepha* e, portanto, se verdadeira, indicaria que essa associação é, provavelmente antiga na história evolutiva desses organismos.

O fato de que diferentes linhagens de *Wolbachia* foram encontradas entre as espécies (ou morfotipos) do complexo *fraterculus*, seria uma indicação de que a incompatibilidade reprodutiva observada entre varias dessas entidades (Selivon *et al.* 2005; Vera *et al.*, 2006; Cáceres *et al.* 2009; Rull *et al.*, 2012), possam ter atuado e estar atuando, dentre outros fatores, a IC provocada pela existência de diferentes linhagens da *Wolbachia*.

Resumo

Wolbachia é uma bactéria intracelular encontrada tanto nos tecidos somáticos quanto nos reprodutivos de diversas espécies de artrópodes e nematódeos. Estudos filogenéticos baseados nos genes 16S e *ftsZ* indicaram que o gênero *Wolbachia* congrega seis supergrupos taxonômicos ("A" a "F"). Infecções por *Wolbachia* têm sido associadas a diversas alterações na reprodução de seus hospedeiros, p. exemplo, a incompatibilidade citoplasmática (IC), partenogênese, feminização de machos genéticos e morte dos machos. A identificação das diferentes cepas da bactéria é mais precisa quando a análise por locos múltiplos (MLST) é aplicada. Infecção por *Wolbachia* foi descrita em diversas espécies de moscas-das-frutas da família Tephritidae, *Bactrocera ascita*, *Rhagoletis cerasi*, *Ceratitidis capitata*, nas quais a bactéria induz a incompatibilidade citoplasmática. No gênero *Anastrepha*, endêmico do Continente Americano, infecção por *Wolbachia* foi descrita em várias espécies pela análise do gene *wsp*, existindo também a indicação de que IC mediada por *Wolbachia* ocorra em duas espécies do grupo *fraterculus*. A ocorrência de IC aliada à sugestão do emprego da *Wolbachia* em programas de controle populacional das moscas-das-frutas, impõem a necessidade de uma caracterização mais precisa das diferentes cepas da *Wolbachia*. No presente trabalho foram amplificados e sequenciados fragmentos dos genes *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *ftsZ* e *fbpA*, que integram a metodologia de MLST ("Multiloci Sequence Typing") e do gene *wsp* da *Wolbachia*. Foram analisadas amostras populacionais do complexo de espécies crípticas de *Anastrepha fraterculus* do Brasil e da Argentina, Peru, Equador, Colômbia, Guatemala e México, além de amostras de *Anastrepha obliqua* do Brasil. Todas as amostras estavam infectadas com *Wolbachia* do supergrupo "A". Para os cinco genes, foram encontrados haplótipos únicos e outros já descritos anteriormente, determinando, assim, os alelos de cada um presentes nas amostras. O conjunto de cinco alelos de cada amostra determinou a linhagem da bactéria que estava presente. Comparação entre as análises filogenéticas das sequências de cada um dos genes isoladamente, mostrou discordância nas relações entre os alelos e amostras populacionais. As sequências dos cinco genes concatenadas, com 2079 pb, foram analisadas tendo sido encontrados 20 linhagens, com distâncias variando de 0,001 a 0,058. A análise filogenética isolou as linhagens de *Wolbachia* obtidas das amostras de *Anastrepha* em clados distintos, demonstrando que diferentes linhagens estão presentes nesses hospedeiros e regiões geográficas. Mostrou, também, que pode ocorrer mais que uma cepa de *Wolbachia* em uma mesma amostra populacional. Uma das linhagens foi detectada em duas espécies do complexo *fraterculus* e é, também, a mais comumente encontrada (ST1) em diferentes organismos. As sequências do *wsp* tinham cerca de 500 pb, tendo sido encontradas 22 sequências distintas. O nível de variabilidade de nucleotídeos não é uniforme ao longo do gene, formando um padrão com quatro regiões hipervariáveis, "HVRs". As distâncias genéticas entre os haplótipos de *wsp* mostrou uma variação de 0,001 a 0,235. Foram observadas evidências de recombinação intragênia entre os haplótipos do gene *wsp*. A análise filogenética também isolou os haplótipos de *Wolbachia* em clados distintos, porém, em contraste com o MLST, a árvore do gene *wsp*, não suporta os grupos monofiléticos gerados pelo MLST. Os resultados mostram que linhagens similares de *Wolbachia* estão disseminadas por vasta extensão do Continente Americano, além da presença de linhagens específicas em determinadas áreas geográficas. Análises de ovários e testículos de indivíduos infectados e não infectados (curados por tratamento térmico) de *A. sp. 1* e de *A. obliqua* foram feitas para avaliar possíveis efeitos da *Wolbachia* nesses hospedeiros. A análise das preparações dos ovários, coradas pelo DAPI, não mostrou diferenças perceptíveis nesta análise morfológica entre fêmeas infectadas e não infectadas, de ambas as espécies. A produção de espermatozoides aumenta progressivamente durante alguns dias, após a emergência das imagos, e cai nos dias seguintes. A análise da produção de

espermatozoides pelos machos infectados e pelos curados mostrou que as diferenças entre eles não foram significativas, em ambas as espécies de hospedeiros. Foram feitas estimativas da fecundidade de fêmeas infectadas e não infectadas, de ambas as espécies. Mostrou-se que fêmeas infectadas são mais fecundas que as não infectadas em *A. sp.1*, mas mostram fecundidade similar em *A. obliqua*. As taxas de eclosão de larvas foram também estimadas em cruzamentos intraespecíficos compatíveis (fêmeas infectadas ou não cruzadas com machos não infectados) e cruzamentos incompatíveis (fêmeas não infectadas cruzadas com machos infectados) de ambas as espécies. A fertilidade foi significativamente mais elevada entre os ovos produzidos pelas fêmeas infectadas, de ambas as espécies. Foi observado que machos infectados, em ambas as espécies, estão relacionados com os cruzamentos onde ocorreram as taxas mais altas de eclosão. Analisando os cruzamentos incompatíveis, foi demonstrada a presença de incompatibilidade citoplasmática (IC), como seria esperado pela atuação da *Wolbachia*. Foi mostrado um alto valor para os índices de IC em *A. sp.1* (IC= 54,01%) e em *A. obliqua* (IC = 66,2%). Os resultados sugerem que podem existir relações mutualísticas insipientes da *Wolbachia* com suas espécies de *Anastrepha* hospedeiras.

Abstract

Wolbachia is an intracellular bacteria found in somatic and in the reproductive tissues of various arthropods and nematodes. Phylogenetic studies based on 16S and *ftsZ* genes indicated the existence of six *Wolbachia* taxonomic supergroups ("A" through "F"). Infection of *Wolbachia* have been linked to several changes in the reproduction of their hosts, like cytoplasmic incompatibility (CI), parthenogenesis, feminization of genetic males and male killing. T *Wolbachia* infection has been described in several species of fruit flies of the family Tephritidae, like *Bactrocera ascita*, *Rhagoletis cerasi*, *Ceratitis capitata*, in which the bacteria induces cytoplasmic incompatibility. In *Anastrepha*, endemic to the American Continent, *Wolbachia* infection has been described in several species by analysis of the *wsp* gene, and there is also indications that *Wolbachia*-mediated CI occurs in two species of the *fraterculus* group. The occurrence of CI coupled with the suggestion of the use of *Wolbachia* in population supression programs, impose the need for a more precise characterization of the different strains of *Wolbachia*. The identification of the different strains of the bacteria is most accurate when the methodology of multiple loci (MLST) is applied. In this study fragments of genes *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *ftsZ* and *fbpA*, integrating the methodology MLST, and of *wsp* gene were amplified and sequenced. Population samples of the *Anastrepha fraterculus* complex of cryptic species from Brasil, Argentina, Peru, Ecuador, Colombia, Guatemala and Mexico, and samples of *A. obliqua* from Basil were analysed. All samples were infected with supergroup "A" *Wolbachia*. For each of the five MLST genes, unique as well already known haplotypes were found. Phylogenetic analyses of each gene isolated showed incongruences in the relationships among haplotypes and population samples. The concatenated sequences of the five genes, with 2079 bp, were analyzed and 20 haplotypes were found, with distances ranging from 0.001 to 0.058. Phylogenetic analysis of *Wolbachia* isolated haplotypes into distinct clades, demonstrating that different strains of *Wolbachia* were present in these hosts, and in distinct geographic areas. Hosts specific haplotypes were found as well as more than one strain of *Wolbachia* was found in given population samples. A haplotypes (ST1) was detected in two species of the complex and is also the most commonly found in different organisms. Twenty two different sequences of about 500 bp were found for the *wsp* gene. The level of nucleotide variability is not uniform along the gene, forming a pattern with four hypervariable regions, HVRs. Genetic distances between haplotypes showed a variation from 0.001 to 0.235. Phylogenetic analysis of the haplotypes also isolated *Wolbachia* into distinct clades, but in contrast to the MLST, the tree formed by *wsp* gene does not support the monophily of some groups. The data show that strains of *Wolbachia* are disseminated along the American Continent, and also that there are specific strains in determined geographic areas. Analyses of ovaries and testes from infected and non infected (cured by heat treatment) individuals of *A. sp. 1* and *A. obliqua* were made in search of possible effects of *Wolbachia* on its hosts. Ovaries from infected and cured females of both species, stained by DAPI, showed no visible differences in this morphological analysis. The production of sperms increases during few days after emergence and drops out later one. Analysis of infected and cured males showed that the production of sperms were not significant between them, for both the host species. Fecundity of infected females of *A. sp.1* was significantly higher than that of cured females, but was similar in *A. obliqua*, Egg hatching was scored in compatible intraspecies crosses and also in incompatibles crosses, of both species. Fertility was significantly higher for infected females of both species. Infected males of both species were found associated to crosses in which the higher egg hatching was observed. Analyses of incompatible crosses showed that CI occurred at high rates in *A. sp.1* (CI = 54.01%) and in *A. obliqua* (CI = 66.2%). The data suggest that an incipient mutualism may be present in the relationships of *Wolbachia* and its *Anastrepha* hosts.

Referências Bibliográficas

- AIKAWA, T.; ANBUTSU, H.; NIKOH, N.; KIKUCHI, T.; SHIBATA, F.; FUKATSU, T. Longicorn beetle that vectors pinewood nematode carries many *Wolbachia* genes on an autosome. **Proceedings Biological Science**, West Sussex, v. 276, n. 1674, p. 3791-3798, 2009.
- ALBERTI, A. C.; CALCAGNO, G.; DAIDMAN, B. O.; VILARDI, J. C. Analysis of the genetic structure of a natural population of *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 92, n. 5, p. 731–736, 1999.
- ALBERTI, A. C.; RODRIGUERO, M. S.; CENDRA, P. G.; SAIDMAN, B. O.; VILARDI, J. C.. Evidence indicating that the Argentine populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae) belong to a single biological species. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 95, p. 505–512, 2002.
- ALMEIDA, F.; MOURA, A. S.; CARDOSO, A. F.; WINTER, C. E.; BIJOVSKY, A. T.; SUESDEK, L. Effects of *Wolbachia* on fitness of *Culex quinquefasciatus* (Diptera; Culicidae). **Infection, Genetics and Evolution**. Amsterdam, v. 11, n. 8, p. 2138-2143, 2011.
- ALUJA, M. Bionomics and management of *Anastrepha*. **Annual Review of Entomology**. Palo Alto, v. 39, p. 1555-1578, 1994.
- AMARAL P. M. **Estudo da variabilidade isozímica de sete locos em larvas de populações naturais de *Anastrepha* (Díptera: Tephritidae)**. 1994. 74 p. Tese de Doutorado, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, USP, São Paulo, 1994.
- ANDERSON, C. L.; KARR, T. L. *Wolbachia*: evolutionary novelty in a rickettsial bacteria. **BMC Evolutionary Biology**. London, v. 1, 10, doi:10.1186/1471-2148-1-10, 2001.
- ARAKAKI, N.; MIYOSHI, T.; NODA, H. *Wolbachia* mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Franklinothrips vespiformis* (Thysanoptera: Insecta). **Royal Society of London. Proceedings B. Biological Sciences**. London, v. 268, p. 1011–1016, 2001.

- ATYAME, C. M.; PASTEUR, N.; DUMAS, E.; TORTOSA, P.; TANTELY, M. L.; POCQUET, N.; LICCIARDI, S.; BHEECARRY, A.; ZUMBO, B.; WEILL, M.; DURON, O. Cytoplasmic incompatibility as a means of controlling *Culex pipiens quinquefasciatus* mosquito in the islands of the south-western Indian Ocean. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. San Francisco, v. 5, n. 12, e1440, 2011.
- BAKER, A. C.; STONE, W. E.; PLUMMER, C. C.; MACPHAIL, H. A review of studies on the mexican fruit fly and related mexican species. **NIST Special Publication**. Gaithersburg, v. 531, p. 1-155, 1944.
- BALDO, L.; LO, N.; WERREN, J. H. Mosaic nature of the *Wolbachia* surface protein. **Journal of Bacteriology**. Washington DC, v. 187, p. 5406–5418, 2005.
- BALDO, L.; DUNNING-HOTOPP, J. C.; JOLLEY, K. A.; BORDENSTEIN, S.; BIBER, A. S.; CHOUDHURY, R. R.; HAYASHI, C.; MAIDEN, M. C. J.; TETTELIN, H.; WERREN, J. H. Multilocus Sequence Typing System for the Endosymbiont *Wolbachia pipientis*. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington DC, v. 72, n. 11, p. 7098–7110, 2006a.
- BALDO, L.; BORDENSTEIN, S.R.; WERNEGREEN, J. J.; WERREN, J. H. Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. **Molecular Biology and Evolution**. Cary, v. 23, p. 437-449, 2006b.
- BALDO, L.; WERREN, J. H. Revisiting *Wolbachia* Supergroup Typing Based on *WSP*: Spurious Lineages and Discordance with MLST. **Current Microbiology**. Secaucus, v. 55, p. 81-87, 2007.
- BALDO, L.; DESJARDINS, C. A.; RUSSELL, J. A.; STALHHUT, J. K; WERREN, J. H. Accelerated microevolution in an outer membrane protein (OMP) of the intracellular bacteria *Wolbachia*. **BMC Evolutionary Biology**. London, v. 10: 48, doi: 10.1186/1471-2148-10-48, 2010.
- BANDI, C.; ANDERSON, T. J. C; GENCHI, C.; BLAXTER, M. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. **Royal Society of London. Proceedings B. Biological Sciences**. Colchester, v. 265, p. 2407–2413, 1998.
- BARR, N. B.; CUI, L.; MCPHERON, B. A.; Molecular systematics of nuclear gene period in genus *Anastrepha* (Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**. Lanham, v. 98, n. 2, p. 173-180, 2005.

- BARTOLUCCI, A.; VERA, M. T.; YUSEF, V.; OVIEDO, A. **Morphological Characterization of the Reproductive System of Irradiated *Anastrepha fraterculus***. Fruit Flies of Economic Importance: From Basic to Applied Knowledge. Proceedings of the 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance. 10-15 September 2006, Salvador, p. 44-52, 2008.
- BASSO, A.; SONVICO, A.; QUESADA-ALLUE, L. A.; MANSO, F. Karyotypic and molecular identification of laboratory stocks of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wiedman) (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**. Lanham, v. 96, n. 4, p. 1237-1244, 2003.
- BEARD, C. B.; O'NEILL, S. L.; TESH, R. B.; RICHARDS, F. F.; AKSOY, S. Modification of arthropod vector competence via symbiotic bacteria. **Trends in Parasitology**. London, v. 9, p. 179-183, 1993.
- BENNETT, G. M.; PANTOJA, N. A.; O'GRADY, P. M. Diversity and phylogenetic relationships of *Wolbachia* in *Drosophila* and other native Hawaiian insects. **Fly**. Austin, v. 6, n. 4, p. 273-283, 2012.
- BINNINGTON, K. L.; HOFFMANN, A. A. *Wolbachia*-like organisms and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. **Journal of Invertebrate Pathology**. Maryland Heights, v. 54, p. 344-352, 1989.
- BORDENSTEIN, S. R.; UY, J. J.; WERREN, J. H. Host genotype determines cytoplasmic incompatibility type in the haplodiploid genus *Nasonia*. **Genetics**. Bethesda, v. 164, p. 223-233, 2003.
- BORDENSTEIN, S.; ROSENGAUS, R. B. Discovery of a novel *Wolbachia* super group in Isoptera. **Current Microbiology**. Secaucus, v. 51, n. 6, p. 393-398, 2005.
- BOURTZIS, K.; NIRGIANAKI, A.; ONYANGO, P.; SAVAKIS, C. A prokaryotic dnaA sequence in *Drosophila melanogaster*. *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility among laboratory strains. **Insect Molecular Biology**. St Albans, v. 3, n. 3, p. 131-142, 1994.
- BOURTZIS, K.; O'NEILL, S. L. *Wolbachia* infections and arthropod reproduction. **Bioscience**. Irvine, v. 48, p. 287-293, 1998.

- BOURTZIS, K. *Wolbachia*-based technologies for insect pest population control. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. New York, v. 627, p. 104-113, 2008.
- BREEUWER, J. A. J.; STOUTHAMER, R.; BURNS, D. A.; PELLETIER, D. A.; WEISBURG, W. G.; WERREN, J. H. Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16s ribosomal DNA sequences. **Insect Molecular Biology**. St Albans, v. 1, p. 25–36, 1992.
- BREEWER, J. A. J.; JACOBS, G. *Wolbachia*: intracellular manipulators of mite reproduction. **Experimental and Applied Acarology**. London, v. 20, n. 8, p. 421-434, 1996.
- BRELSFOARD, C. L.; DOBSON, S. L. *Wolbachia* Effects on Host Fitness and the Influence of Male Aging on Cytoplasmic Incompatibility in *Aedes polynesiensis* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**. Lanham, v. 48, n. 5, p. 1008-1015, 2011.
- BUSH, G. L. The cytotaxonomy of the larvae of some Mexican fruit flies in the genus *Anastrepha* (Tephritidae: Diptera). *Psyche*. Stuttgart, v. 6, p. 87-101, 1962.
- CACERES, C.; SEGURA, D. F.; VERA, M. T.; WORNOPYORN, V.; CLADERA, J. L.; TEAL, P.; SAPOUNTZIS, P.; BOURTZIS, K.; ZACHAROPOULOU, A.; ROBINSON, A. S. Incipient speciation revealed in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) by studies on mating compatibility, sex pheromones, hybridization, and cytology. **Linnean Society. Biological Journal**. West Sussex, v. 97, p. 152–165, 2009.
- CALLAINI, G.; DALLAI, R.; RIPARBELLI, M. G. *Wolbachia*-induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes from entering anaphase in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. **Journal of Cell Science**. Cambridge, v. 110, n. 2, p. 271–280, 1997.
- CALVITTI, M.; MORETTI, R.; LAMPAZZI, E.; BELLINI, R.; DOBSON, S. L. Characterization of a new *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)-*Wolbachia pipientis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) symbiotic association generated by artificial transfer of the wPip strain from *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**. Lanham, v. 47, p. 179–187, 2010.

- CANAL N. A.; ZUCCHI, R. A. Parasitoides-Braconidae. In: Malavasi A.; Zucchi RA (ed). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto (SP). Holos Editora, 2000, p. 119-126.
- CASIRAGHI, M.; BORDESSTEIN, S. R.; BALDO, L.; LO, N.; BENINATI, T.; WERNEGREN, J. J.; WERREN, J. H.; BANDI, C. Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. **Microbiology**. Berkshire, v. 151, n. 12, p. 4015-4022, 2005.
- CHARLAT, S.; RIEGLER, M.; BAURES, I.; POINSOT, D.; STAUFFER, C. Incipient evolution of *Wolbachia* compatibility types. **Evolution**. Oxford, v. 58, p. 1901–1908, 2004.
- CLARK, M. E.; VENETI, Z.; BOURTZIS, K.; KARR, T. L. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility during sperm development: the cyst as the basic cellular unit of CI expression. **Mechanisms of Development**. Amsterdam, v. 120, p. 185-193, 2003.
- COSCRATO, V. E.; BRAZ, A. S. K.; PERONDINI, A. L. P.; SELIVON, D.; MARINO, C. L. *Wolbachia* in *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae). **Current Microbiology**. Secaucus, v. 59, p. 295-301, 2009.
- CRESPIGNY, F. E.; PITT, T. D.; WEDELL, N. Increased male mating rate in *Drosophila* is associated with *Wolbachia* infection. **Journal of Evolutionary Biology**. Oxford, v. 19, n. 6, p. 1964-1972, 2006.
- CZARNETZKI, A. B.; TEBBE, C. C. Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in Collembola. **Environmental Microbiology**. West Sussex, v. 6, p. 35–44, 2004.
- DEDEINE, F.; BOULETREAU, M.; VAVRE, F. *Wolbachia* requirement for oogenesis: occurrence within the genus *Asobara* (Hymenoptera, Braconidae) and evidence for intraspecific variation in *A. tabida*. **Heredity**. London, v. 95, p. 394–400, 2005.
- DOBSON, S. L.; BOURTZIS, K.; BRAIG, H. R. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. Oxford, v. 29, p. 153-160, 1999.
- DOBSON, S. L.; FOX, C. W.; JIGGINS, F. M. The effect of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility on host population size in natural and manipulated

- systems. **Proceedings Biological Sciences**. West Sussex, v. 269, n. 1940, p. 437-445, 2002.
- DUNNING-HOTOPP, J. C.; CLARK, M. E.; OLIVEIRA, D. C.; FOSTER, J. M.; FISCHER, P.; MUÑOZ TORRES M. C.; GIEBEL, J. D.; KUMAR, N.; ISHMAEL, N.; WANG, S.; INGRAM, J.; NENE, R. V.; SHEPARD, J.; TOMKINS, J.; RICHARDS S.; SPIRO, D. J.; GHEDIN, E.; SLATKO, B. E.; TETTELIN, H.; WERREN, J. H. Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. **Science**. Washington DC, v. 317, n. 5845, p. 1753-1756, 2007.
- ESTEBAN, M. R.; CAMPOS, M. C. C.; PERONDINI, A. L. P.; GODAY, C. Role of microtubules and microtubule organizing centers on meiotic chromosome elimination in *Sciara ocellaris*. **Journal of Cell Science**. Cambridge, v. 110, p. 721-730, 1997.
- EVANS, O.; CARAGATA, E. P.; MCMENIMAN, C. J.; WOOLFIT, M.; GREEN, D. C.; WILLIAMS, C. R.; FRANKLIN, C. E.; O'NEILL, S. L.; MCGRAW, E. A. Increased locomotor activity and metabolism of *Aedes aegypti* infected with a life-shortening strain of *Wolbachia pipientis*. **The Journal of Experimental Biology**. Queensland, v. 212, p. 1436–1441, 2009.
- FELSENSTEIN, J. PHYLIP -- Phylogeny Inference Package (Version 3.2). **Cladistics**. West Sussex, v. 5, p. 164-166, 1989.
- FIALHO, R. F.; STEVENS, L. Male-killing *Wolbachia* in flour beetle. **Royal Society of London. Proceedings B. Biological Sciences**. London, v. 267, p. 1469-1473, 2000.
- FIGUEIREDO, J. V. A.; PERONDINI, A. L. P.; RUGGIRO, E. M.; PREZOTTO, L. F.; SELIVON, D. External eggshell morphology of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae). **Acta Zoologica**. West Sussex, v. 00, p. 1-9, 2011.
- GHELELOVITCH, S. Sur le déterminisme génétique de la stérilité dans le croisement entre différentes souches de *Culex autogenicus* Roubaud. **Academie des Sciences. Comptes Rendus. Biologies**. Cedex, v. 24, p. 2386–88, 1952.
- GODAY, C.; SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P.; GRECIANO, P. G.; RUIZ, M. F. Cytological characterization of sex chromosomes and ribosomal DNA location in *Anastrepha* species (Diptera, Tephritidae). **Cytogenetic and Genome Research**. Basel, v. 114, p. 70-76, 2006.

- GORHAM, C. H.; FANG, Q. Q.; DURDEN, L. A. *Wolbachia* endosymbionts in fleas (Siphonaptera). **The Journal of Parasitology**. Lincoln, v. 89, n. 2, p. 283-289, 2003.
- HEATH, L., VAN DER WALT, E., VARSANI, A. & MARTIN D. P. Recombination patterns in aphthoviruses mirror those found in other picornaviruses. **Journal of Virology**. Washington DC, v. 80, p. 11827-11832, 2006.
- HEDGES, L. M.; BROWNLIE, J. C.; O'NEILL, S. L.; JOHNSON, K. N. *Wolbachia* and virus protection in insects. **Science**. Washington DC, v. 322, n. 5902, p. 702, 2008.
- HERNANDEZ-ORTIZ, V.; GOMEZ-ANAYA, J. A.; SINCHEZ, A.; MCPHERON, B. A.; ALUJA, M. Morphometric analysis of Mexican and South American populations of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera:Tephritidae) and recognition of a distinct Mexican morphotype. **Bulletin of Entomological Research**. Cambridge, v. 94, p. 487-499, 2004.
- HERNANDEZ-ORTIZ, V.; BARTOLUCCI, A. F.; MORALES-VALLES, P.; FRÍAS, D.; SELIVON, D. Cryptic Species of the *Anastrepha fraterculus* Complex (Diptera: Tephritidae): A Multivariate Approach for the Recognition of South American Morphotypes. **Entomological Society of America**. Lanham, v. 105, n. 2, p. 305-318, 2012.
- HERTIG, M.; WOLBACH, S. B. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. **The Journal of Medical Research**. New York, v. 44, n. 3, p. 329-74, 1924.
- HERTIG M. The rickettsia, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito *Culex pipiens*. **Parasitology**. Cambridge, v. 28, p. 453-86, 1936.
- HILGENBOECKER, H.; HAMMERSTEIN, P.; SCHLATTMANN, P.; TELSCHOW, A.; WERREN, J. H. How many species are infected with *Wolbachia*? - A statistical analysis of current data. **FEMS Microbiology Letters**. Oxford, v. 281, p. 215-220, 2008.
- HIROKI, M.; KATO, Y.; KAMITO, T.; MIURA, K. Feminization of genetic males by a symbiotic bacterium in a butterfly, *Eurema hecabe* (Lepidoptera: Pieridae). **Naturwissenschaften**. Heidelberg, v. 89, p. 167-170, 2002.

- HOFFMAN, A. A.; TURELLI, M.; SIMMONS, G. M. Unidirectional incompatibility between populations of *Drosophila simulans*. **Evolution**. Oxford, v. 40, p. 692–701, 1986.
- HOFFMANN, A. A. Partial cytoplasmic incompatibility between two Australian populations of *Drosophila melanogaster*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. West Sussex, v. 48, n. 1, p. 61–67, 1988.
- HOFFMAN, A. A.; TURELLI, M. Unidirectional incompatibility in *Drosophila simulans*: inheritance, geographic variation and fitness effects. **Genetics**. Bethesda, v. 119, p. 435–444, 1988.
- HOFFMANN, A. A.; TURELLI, M.; HARSHMAN, L. G. Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. **Genetics**. Bethesda, v. 126, p. 933–948, 1990.
- HOFFMANN, A. A.; HERCUS, M.; DAGHER, H. Population dynamics of the *Wolbachia* infection causing cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**. Bethesda, v. 148, p. 221–31, 1998.
- HSIAO, C.; HSIAO, T. H. Rickettsia as the cause of cytoplasmic incompatibility in the alfalfa weevil, *Hypera postica*. **Journal of Invertebrate Pathology**. Maryland Heights, v. 45, n. 2, p. 244–46, 1985.
- HURST, G. D.; JIGGINS, F. M.; VON DER SCHULENBURG, J. H. G.; BERTRAND, D.; STUART, A. W.; GORIACHEVA, I. I.; ZAKHAROV, I. A.; WERREN, J. H.; STOUTHAMER, R.; MAJERUS, M. E. N. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. **Royal Society of London. Proceedings B. Biological Sciences**. London, v. 266, p. 735–740, 1999.
- HURST, G. D.; JOHNSON, A. P.; VON DER SCHULENBURG, J. H. G.; FUYAMA, Y. Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: a temperature sensitive trait with a threshold bacterial density. **Genetics**. Bethesda, v. 156, p. 699–709, 2000.
- JAENIKE, J. 2007. Spontaneous emergence of a new *Wolbachia* phenotype. **Evolution**. Rochester, v. 61, p. 2244–2252, 2000.
- JAMNONGLUK, W.; KITTAYAPONG, P.; BAIMAI, V.; O'NEILL, S. L. *Wolbachia* infections of tephritid fruit flies: molecular evidence for five distinct strains in a single host species. **Current Microbiology**. Secaucus, v. 45, p. 255–260, 2002.

- JEYAPRAKASH, A.; HOY, M. A. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. **Insect Molecular Biology**. St Albans, v. 9, p. 393–405, 2000.
- JIGGINS, F. M.; HURST, G. D. D.; MAJERUS, M. E. N. Sex-ratio-distorting *Wolbachia* causes sex-role reversal in its butterfly host. **Royal Society of London. Proceedings B. Biological Sciences**. London, v. 267, p. 69-73, 2000.
- JIGGINS, F. M.; VON DER SCHULENBURG, J. H.; HURST, G. D.; MAJERUS, M. E. Recombination confounds interpretations of *Wolbachia* evolution. **Royal Society of London. Proceedings B. Biological Sciences**. London, v. 268, n. 1474, p. 1423-1427, 2001.
- JOWETT, T. Preparation of nucleic acids. In: ***Drosophila: A Practical Approach***. DB Roberts, ed *Roberts B* (Information Printing, Oxford). p. 275–286, 1986.
- JUCHAULT, P.; FRELON, M.; BOUCHON, D.; RIGAUD, T. New evidence for feminizing bacteria in terrestrial isopods: evolutionary implications. **Academie des Sciences. Comptes Rendus. Biologies**. Cedex. v. 317, p. 225–30, 1994.
- KAGEYAMA, D.; NISHIMURA, G.; HOSHIZAKI, S.; ISHIKAWA, Y. Feminizing *Wolbachia* in an insect, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Heredity**. London, v. 88, n. 6, p. 444-449, 2002.
- KAWAMURA, N. Fertilization and the first cleavage mitosis in insects. **Development, Growth & Differentiation**. Richmond, v. 43, p. 343–49, 2001.
- KAWASAKI, Y.; ITO, M.; MIURA, K.; KAJIMURA, H. Superinfection of five *Wolbachia* in the alnus ambrosia beetle, *Xylosandrus germanus* (Blandford) (Coleoptera: Curculionidae). **Bulletin of Entomological Research**. Cambridge, v. 100, n. 2, p. 231-239, 2010.
- KITTAYAPONG, P.; MILNE, J. R.; TIGVATTANANONT, S.; BAIMAI, V. Distribution of the reproduction-modifying bacteria, *Wolbachia*, in natural populations of tephritid fruit flies in Thailand. **Science Asia**. Bangkok, v. 26, p. 93-103, 2000.

- KITTAYAPONG, P.; MONGKALANGOON, P.; BAIMAI, V.; O'NEILL, S. L. Host age effect and expression of cytoplasmic incompatibility in field populations of *Wolbachia*-superinfected *Aedes albopictus*. **Heredity**. London, v. 88, n. 4, p. 270-274, 2002.
- KITTAYAPONG, P.; JAMNONGLUK, W.; THIPAKSORN, A.; MILNE, J. R.; SINDHUSAKE, C. *Wolbachia* infection complexity among insects in the tropical rice-field community. **Molecular Ecology**. Oxford, v. 12, n. 4, p. 1049-1060, 2003.
- KLASSON, L.; KAMBRIS, Z.; COOK, P. E.; WALKER, T.; SINKINS, S. P. Horizontal gene transfer between *Wolbachia* and the mosquito *Aedes aegypti*. **BMC Genomics**. London, v. 20, p. 10-33, 2009.
- KOUKOU, K., PAVLIKAKI, H.; KILIAS, G.; WERREN, J. H.; BOURTZIS, K.; ALAHOTIS, S. N. Influence of antibiotic treatment and *Wolbachia* curing on sexual isolation among *Drosophila melanogaster* cage populations. **Evolution**. Oxford, v. 60, n. 1, p. 87-96, 2006.
- KRAAIJEVELD, K.; FRANCO, P.; DE KNIJFF, P.; STOUTHAMER, R.; VAN ALPHEN, J. J. Clonal genetic variation in a *Wolbachia*-infected asexual wasp: horizontal transmission or historical sex? **Molecular Ecology**. Oxford, v. 20, n. 17, p. 3644-3652, 2011.
- KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American Statistical Association**. Baltimore, v. 47, p. 583-621, 1952.
- LASSY, C. W.; KARR, T. Cytological analysis of fertilization and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. **Mechanisms of Development**. Shannon, v. 57, p. 47-58, 1996.
- LAVAGNOLLI, T. M. C.; MASCARENHAS, R. O.; ROCHA, L. S.; PERONDINI, A. L.; SELIVON, D. **Detecção de Wolbachia em amostras de insetos da região Neotropical**. In: 51º Congresso Nacional de Genética, 2005, Águas de Lindóia, SP, resumo em CD-ROM.
- LAVEN, H. Crossing experiments with *Culex* strains. **Evolution**. Oxford, v. 5, p. 370-75, 1951.

- LAVEN, H. Speciation by cytoplasmic isolation in the *Culex pipiens* complex. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**. Woodbury, v. 24, p. 166–73, 1959.
- LAVEN H. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. **Nature**. London, v. 261, p. 383–84, 1967.
- LEU, S. J. C.; LI, J. K. K.; HSIAO, T. H. Characterization of *Wolbachia postica*, the cause of reproductive incompatibility among alfalfa weevil strains. **Journal of Invertebrate Pathology**. Maryland Heights, v. 54, p. 248–59, 1989.
- LO, N.; CASIRAGHI, M.; SALATI, E.; BAZZOCCHI, C.; BANDI, C. How many *Wolbachia* supergroups exist? **Molecular Biology and Evolution**. Cary, v. 19, p. 341–346, 2002.
- LOUIS, C.; NIGRO, L. Ultrastructural evidence of *Wolbachia* Rickettsiales in *Drosophila simulans* and their relationships with unidirectional crossincompatibility. **Journal of Invertebrate Pathology**. Maryland Heights, v. 54, p. 39–44, 1989.
- MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A.; SUGAYAMA, R. L. Biogeografia. Em: “**Moscas das frutas de interesse econômico no Brasil: conhecimento básico e aplicado**”, Malavasi, A. e Zucchi, R.A. (eds.), Holos, Ribeirão Preto. 93-98, 2000.
- MASCARENHAS, R. O. **Endossimbionte *Wolbachia* em moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* (Tephritidae) e em vespas parasitóides (*Braconidae*) associadas**. 2007. 80p. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2007.
- MARCON H. S. **Identificação da bactéria endossimbionte *Wolbachia* em populações de moscas-das-frutas do complexo *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae)**. 2009. 111p. Dissertação de Mestrado- Instituto de Biociências, Unesp, Botucatu, SP, 2009.
- MARCON, H. S.; COSCRATO, V. E.; SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P.; MARINO, C. L. Variations in the sensitivity of different primers for detecting *Wolbachia* in *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). **Brazilian Journal of Microbiology (Impresso)**. Rio de Janeiro, v. 42, p. 778-785, 2011a.

- MARCON, H. S.; DOMINGUES, D. S.; COSCRATO, V. E.; SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P.; MARION, C. L. New mariner elements in *Anastrepha* species (Diptera: Tephritidae). **Neotropical Entomology**. Dordrecht, v. 40, n. 5, p. 568-574, 2011b.
- MARTÍNEZ, H.; TOLEDO, J.; LIEDO, P.; MATEOS, M. Survey of Heritable Endosymbionts in Southern Mexico Populations of the Fruit Fly Species *Anastrepha striata* and *A. ludens*. **Current Microbiology**. Secaucus, v. 65, n. 6, p. 711-718, 2012.
- MAYNARD SMITH, J. (1992). Analyzing the mosaic structure of genes. **Journal of Molecular Evolution**. Secaucus, v. 34, p. 126-129, 1992.
- MCMENIMAN CJ, LANE RV, CASS BN, FONG AW, SIDHU M, WANG YF, O'NEILL SL. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. **Science**. Washington DC, v. 323, p. 141–144, 2009.
- MCNULTY, S. N.; FOSTER, J. M.; MITREVA, M.; DUNNING-HOTOPP, J. C.; MARTIN, J.; FISCHER, K.; WU, B.; DAVIS, P. J.; KUMAR, S.; BRATTIG, N. W.; SLATKO, B. E.; WEIL, G. J.; FISCHER, P. U. Endosymbiont DNA in endobacteria-free filarial nematodes indicates ancient horizontal genetic transfer. **PLoS ONE**. San Francisco, v. 5, n. 6, e11029, 2010.
- MCPHERON, B. A.; HAN, H. Y.; SILVA, J. G.; NORRBOM, A. L. **Phylogeny of genus *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based upon 16S rDNA mitochondrial sequences**. In: Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior, M. Aluja e A.L. Norrbom (eds.), CRC Press, Boca Ratón, Florida. 343-361, 1999.
- MENDES, L. O. T. Observações citológicas em “moscas-das-frutas”. **Bragantia**. Campinas, v. 17, p. 29-39, 1958.
- MILLER, W. J.; EHRMAN, L.; SCHNEIDER, D. Infectious speciation revisited: Impact of Symbiont-Depletion on female fitness and mating behavior of *Drosophila paulistorum*. **PLoS Pathogens**. San Francisco, v. 6, n. 12, e1001214, 2010.
- MOREIRA, L. A.; ITURBE-ORMAETXE, I.; JEFFREY, J. A.; LU, G.; PYKE, A. T.; HEDGES, L. M.; ROCHA, B. C.; HALL-MENDELIN, S.; DAY, A.; RIEGLER, M.; HUGO, L. E.; JONHSON, K. N.; KAY, B. H.; MCGRAW, E. A.; VAN DEN HURK, A. F.; RYAN, P. A.; O'NEILL, S. L. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. **Cell**. Cambridge, v. 139, p. 1268–1278, 2009a.

- MOREIRA, L. A.; SAIG, E.; TURLEY, A. P.; RIBEIRO, J. M.; O'NEILL, S. L.; MCGRAW, E. A. Human probing behavior of *Aedes aegypti* when infected with a life-shortening strain of *Wolbachia*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. San Francisco, v. 3, e568.
- MORGANTE, J. S.; MALAVASI, A.; BUSH, G. L. Biochemical systematics and evolutionary relationships of neotropical *Anastrepha*. **Annals of the Entomological Society of America**. Lanham, 73, p. 622-30, 1980.
- MORGANTE, J. S.; SELIVON, D.; SOLFERINI, V. N.; MATIOLI, S. R. **Evolutionary patterns in specialist and generalist species of *Anastrepha***. 133-47. In: M.Aluja & P. Liedo (eds.). *Fruit Flies: biology and management*. Springer, New York. Proceedings of the 3th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, 1993.
- NARITA, S.; SHIMAJIRI, Y.; NOMURA, M. Strong cytoplasmic incompatibility and high vertical transmission rate can explain the high frequencies of *Wolbachia* infection in Japanese populations of *Colias erate poliographus* (Lepidoptera: Pieridae). **Bulletin of Entomological Research**. Cambridge, v. 99, n. 4, p. 385-391, 2008.
- NEGRI, I., PELLECCIA, M., MAZZOGLIO, P. J., PATETTA, A.; ALMA, A. Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pulula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/XO sex determination system. **Royal Society of London. Proceedings B. Biological Sciences**. London, v. 273, p. 2409–2416, 2008.
- NODA, H. Cytoplasmic incompatibility in allopatric field populations of the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*, in Japan. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. West Sussex, v. 35, p. 263–67, 1984.
- NODA, H. Further studies on cytoplasmic incompatibility in local populations of *Laodelphax striatellus* in Japan (Homoptera: Delphacidae). **Applied Entomology and Zoology**. Tokyo, v. 22, p. 443–48, 1987.
- NORRBOM, A. L.; ZUCCHI, R. A.; HERNÁNDEZ-ORTIZ, V. **Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based on morphology**. p. 299-342. In: *Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior*. Aluja, M., Norrbom, A.L. (eds.) CRC Press, Boca Ratón, Florida, 1999.
- O'NEILL, S. L. Cytoplasmic symbionts in *Tribolium confusum*. **Journal of Invertebrate Pathology**. Maryland Heights, v. 53, p. 132–34, 1989.

- O'NEILL, S. L.; GIORDANO, R.; COLBERT, A. M. E.; KARR, T. L.; ROBERTSON, H. M. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. **National Academy of Sciences. Proceedings**. Washington DC, v. 89, p. 2699–702, 1992.
- PANARAM, K.; MARSHALL, J. L. F supergroup *Wolbachia* in bush crickets: what do patterns of sequence variation reveal about this supergroup and horizontal transfer between nematodes and arthropods? **Genetica**. Dordrecht, v. 130, p. 53-60, 2007.
- PANNEBAKKER, B. A.; PIJNACKER, L. P.; ZWAAN, B. J.; BEUKEBOOM, L. W. Cytology of *Wolbachia*-induced parthenogenesis in *Leptopilina clavipes* (Hymenoptera: Figitidae). **Genome**. Ottawa, v. 47, p. 299–303, 2004.
- PANNEBAKKER, B. A.; LOPPIN, B.; ELEMANS, C. P. H.; HUMBLLOT, L.; VAVRE, F. Parasitic inhibition of cell death facilitates symbiosis. **National Academy of Sciences. Proceedings**. Washington DC, v. 104, n. 1, p. 213-215, 2007.
- PARASKEVOPOULOS, C.; BORDENSTEIN, S. R.; WERNEGREEN, J.; WERREN, J. H.; BOURTZIS, K. Towards a *Wolbachia* Multi Locus Strain Typing system: Discrimination of *Wolbachia* strains present in *Drosophila* species. **Current Microbiology**. Secaucus, v. 53, p. 388-395, 2006.
- PENG, Y.; NIELSEN, J. E.; CUNNINGHAM, J. P.; MCGRAW, E. A. *Wolbachia* infection alters olfactory-cued locomotion in *Drosophila* spp. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington DC, v. 74, n. 13, p. 3943-3948, 2008.
- PERONDINI A. L. P. Um aparelho para contagem de grão nos autorradiogramas. *Ciência e Cultura*. São Paulo, v. 23, p. 86-87, 1971.
- PIRES, A. O. **Variações no padrão simétrico de cerdas em diferentes condições de desenvolvimento em *Anastrepha* (Diptera, Tephritidae)**. Tese de Doutorado, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2005.
- POINSOT, D.; BOURTZIS, K.; MARKAKIS, G.; SAVAKIS, C.; MERCOT, H. *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. **Genetics**. Bethesda, v. 150, p. 227–237, 1998.
- PREZOTTO, L. F. **Análise do ITS1 do DNA ribossômico em espécies do complexo *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae)**. 2008, 66p. Dissertação Mestrado,

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2008.

RAYCHOUDRY, R.; BALDO, L.; OLIVEIRA, D. C. S. G.; WERREN, J. H. Modes of acquisition of *Wolbachia*: Horizontal transfer, hybrid introgression, and codivergence in the *Nasonia* species complex. **Evolution**. Oxford, v. 63, n. 1, p. 165–183, 2009.

REED, K. M.; WERREN, J. H. Induction of paternal genome loss by the paternal-sex-ratio chromosome and cytoplasmic incompatibility bacteria (*Wolbachia*): a comparative study of early embryonic events. **Molecular Reproduction and Development**. Hoboken, v. 40, p. 408–418, 1995.

RIBEIRO, R. M. ***Wolbachia* e Incompatibilidade Citoplasmática em *Anastrepha* sp.1 *affinis fraterculus* e *A. obliqua* (Díptera: Tephritidae)**. 2009, 52 p. Dissertação Mestrado, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2009.

RICHARDSON, P. M.; HOLMES, W. P.; SAUL, G. I. I. The effect of tetracycline on reciprocal cross incompatibility in *Mormoniella* (*D. Nasonia*) *vitripennis*. **Journal of Invertebrate Pathology**. Maryland Heights, v. 50, p. 176–83, 1987.

RIEGLER, M.; STAUFFER, C. *Wolbachia* infections and superinfections in cytoplasmically incompatible populations of the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). **Molecular Ecology**. Oxford, v. 11, p. 2425-2434, 2002.

RIGAUD, T.; SOUTY-GROSSET, C.; RAIMOND, R.; MOCQUARD, J. P.; JUCHAULT, P. Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda): recent acquisitions. **Endocytobiosis and Cell Research**. Munich, v. 7, p. 259–73, 1991.

ROCHA, L. S.; MASCARENHAS, R. O.; PERONDINI, A. L. P.; SELIVON, D. Occurrence of *Wolbachia* in Brazilian Samples of *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Neotropical Entomology**. Dordrecht, v. 34, n. 6, p. 1013-1015, 2005.

ROUSSET, F.; BOUCHON, D.; PINTUREAU, B.; JUCHAULT, P.; SOLIGNAC, M. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. **Royal Society of London. Proceedings B. Biological Sciences**. London, v. 250, p. 91–98, 1992.

- ROWLEY, S. M.; RAVEN, R. J.; MCGRAW, E. A. *Wolbachia pipientis* in Australian spiders. **Current Microbiology**. Secaucus, v. 49, n. 3, p. 208-214, 2004.
- ROZAS, J.; LIBRADO, P. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**. Oxford, v. 25, n.11, p. 1451-1452, 2009.
- RULL, J.; ABRAHAM, S.; KOVALESKI, A.; SEGURA, D. F.; ISLAM, A.; WORNOPYORN, V.; DAMMALAGE, T.; SANTO TOMAS, U.; VERA, M. T. Random mating and reproductive compatibility among Argentinean and southern Brazilian populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Bulletin of Entomological Research**. Cambridge, v. 102, n. 04, p. 435-443, 2012.
- SAMBROOK, J.; FRISCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. V. 1–3, 1989.
- SANTOS, P. **Variabilidade do DNA mitocondrial em populações de três espécies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae)**. 1994. 312p. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1994.
- SASAKI, T.; ISHIKAWA, H. Transinfection of *Wolbachia* in the mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*, by embryonic microinjection. **Heredity**. London, v. 85, p. 130–135, 2000.
- SELIVON, D.; MORGANTE, J. S.; RIBEIRO, A. F.; PERONDINI, A. L. P. Extrusion of masses of yolk during embryony development of the fruit fly *Anastrepha fraterculus*. **Invertebrate Reproduction and Development**. Rehovot, v. 29, p. 1-7, 1996.
- SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P. Eggshell morphology in two cryptic species of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**. Lanham, v. 91, p. 473-478, 1998.
- SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P.; MORGANTE, J. S. Haldane's rule and other aspects of reproductive isolation observed in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). **Genetics and Molecular Biology**. Ribeirão Preto, v. 22, p. 507–510, 1999.

- SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P.; RIBEIRO, A. F.; MARINO, C. L.; LIMA, M. M. A.; COSCRATO, V. E. *Wolbachia* endosymbiont in a species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Anastrepha: Diptera: Tephritidae). **Invertebrate Reproduction & Development**. Rehovot, v. 42, p. 121-127, 2002.
- SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P.; GODAY, C.; SÁNCHEZ, L.; RUIZ, M. F. **Caracterização de regiões heterocromáticas dos cromossomos mitóticos e do DNA ribossômico de espécies de *Anastrepha* (Diptera, Tephritidae)**. 50^o Congresso Nacional de Genética, Florianópolis, Setembro de 2004 (CD do Congresso), 2004a.
- SELIVON, D.; VRETOS, C.; FONTES, L.; PERONDINI, A. L. P. **New variant forms in the *Anastrepha fraterculus* complex**, p. 253-258. Proc. 6th International Fruit Flies Symposium, 6-10 May, Stellenbosh, South Africa, B. Barnes (ed.), Isteg Scientific Publications, Irene, South Africa, 2004b.
- SELIVON, D., PERONDINI, A. L. P.; MORGANTE, J. S. A genetic-morphological characterization of two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**. Lanham, v. 98, n. 3, p. 367-381, 2005.
- SALUNKE, B.K.; SALUNKHE, R.C.; DHOTRE, D. P.; WALUJKAR, S. A.; KHANDAGALE, A. B.; CHAUDHARI, R.; CHANDODE, R. K.; GHATE, H. V.; PATOLE, M. S.; WERREN, J. H.; SHOUCHE, Y. S. Determination of *Wolbachia* diversity in butterflies from Western Ghats, India, by a multigene approach. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington DC, v. 78, n. 12, p. 4458-4467, 2012.
- SERBUS, L. R.; CASPER-LINDLEY, C.; LANDMANN, F.; SULLIVAN, W. The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions. **Annual Review of Genetics**. Palo Alto, v. 42, p. 683-707, 2008.
- SHOEMAKER, D. D.; MACHADO, C. A.; MOLBO, D.; WERREN, J. H.; WINDSOR, D. M.; Herre, E. A. The distribution of *Wolbachia* in fig wasps: correlations with host phylogeny, ecology and population structure. **Royal Society of London. Proceedings B. Biological Sciences**. London, v. 269, n. 1506, p. 2257-2267, 2002.

- SMITH-CALDAS, M. R. B.; MCPHERON, B. A.; SILVA, J. G.; ZUCCHI, R. A. Phylogenetic relationships among species of the *fraterculus* group (Anastrepha: Diptera: Tephritidae) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I. **Neotropical Entomology**. Dordrecht, v. 30, p. 565-573, 2001.
- SNOOK, R. R.; CLELAND, S. Y.; WOLFNER, M. F.; KARR, T. L. Offsetting Effects of Wolbachia Infection and Heat Shock on Sperm Production in *Drosophila simulans*: Analyses of Fecundity, Fertility and Accessory Gland Proteins. **Genetics**. Rockville Pike, v. 155, p. 167-178, 2000.
- SOLFERINI, V. N.; MORGANTE, J. S. Karyotype study of eight species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). **Caryologia**. Florence, v. 40, p. 229-41, 1987.
- STECK, G. J. Biochemical systematics and population genetic structure of *Anastrepha fraterculus* and related species (Diptera: Tephritidae). **Entomological Society of America. Annals**. Lanham, v. 84, p. 10-28, 1991.
- STECK, G. J.; SHEPPARD, W. S. **Mitochondrial DNA variation in *Anastrepha fraterculus***. In: M. Aluja P. Liedo Fruit flies biology and management. 9-14. Springer New York, 1993.
- STONE, A. The fruit flies of the genus *Anastrepha*. U.S. **Department Of Agriculture, Miscellaneous Publication**. Washington DC, n. 439, p. 1-112, 1942.
- STOUTHAMER, R.; LUCK, R. F.; HAMILTON, W. D. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. **National Academy of Sciences. Proceedings**. Washington DC, v. 87, p. 2424–2427, 1990.
- STOUTHAMER, R.; LUCK, R. F. Influence of microbe-associated parthenogenesis on the fecundity of *Trichogramma deion* and *T. pretiosum*. **Entomologia Experimentalis Applicata**. West Sussex, v. 67, p. 183–192, 1993.
- STOUTHAMER, R.; KAZMER, D. J. Cytogenetics of microbe associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. **Heredity**. London, v. 73, p. 317–327, 1994.
- SUESDECK-ROCHA, L.; BERTANI, R.; SILVA-JUNIOR, P. I.; SELIVON, D. The first record for *Wolbachia* in a scorpion: the parthenogenetic yellow scorpion *Tityus*

- serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). **Revista Iberica de Aracnología**. Zaragoza, v. 14, p.183-184, 2007.
- SUN, S.; CLINE, T. W. Effects of *Wolbachia* infection and ovarian tumor mutations on sex-lethal germline functioning in *Drosophila*. **Genetics**. Rockville Pike, v. 181, p. 1291-1301, 2009.
- TAVARÉ, S. "Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences". **Lectures on Mathematics in the Life Sciences (American Mathematical Society)**. Providence, v. 17, p. 57–86, 1986.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**. Cary, v. 28, p. 2731-2739, 2011.
- TEIXEIRA, L.; FERREIRA, A.; ASHBURNER, M. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. **PLoS Biology**. San Francisco, v. 6, n. 12, p. 2753-2763, 2008.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. ClustalW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix. **Nucleic Acids Research**. Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.
- TRAM, U.; SULLIVAN, W. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. **Science**. Washington DC, v. 296, p. 1124–1126, 2002.
- TRAM, U.; FERREE, P. M.; SULLIVAN, W. Identification of *Wolbachia*-host interacting factors through cytological analysis. **Microbes and Infection**. Cedex, v. 5, n. 11, p. 999-1011, 2003.
- TRAM, U.; FREDRICK, K.; WERREN, J. H.; SULLIVAN, W. Paternal chromosome segregation during the first mitotic division determines *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility phenotype. **Journal of Cell Science**. Cambridge, v. 119, p. 3655–3663, 2006.

- TURLEY, A. P.; MOREIRA, L. A.; O'NEILL, S. L.; MCGRAW, E. A. *Wolbachia* Infection Reduces Blood-Feeding Success in the Dengue Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. San Francisco, v. 3, n. 9, e516, 2009.
- VANDEKERCKHOVE, T. T.; WATTEYNE, S.; WILLEMS, A.; SWINGS, J. G.; MERTENS, J.; GILLIS, M. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the cytoplasmic bacterium *Wolbachia* from the novel host *Folsomia candida* (Hexapoda, Collembola) and its implications for *wolbachial* taxonomy. **FEMS Microbiology Letters**. Oxford, v. 180, p. 279–286, 1999.
- VAVRE, F.; FLEURY, F.; LEPETIT, D.; FOUILLET, P.; BOULÉTREAU, M. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. **Molecular Biology and Evolution**. Cary, v. 16, n. 12, p. 1711-1723, 1999.
- VERA, M. T.; CÁCERES, C.; WORNOPORN, V.; ISLAM, A.; ROBINSON, A. S.; DE LA VEJA, M. H.; HENDRICH, J.; CAYOL, J. P. Mating Incompatibility Among Populations of the South American Fruit Fly *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Entomological Society of America. Annals**. Lanham, v. 99, n. 2, p. 387-397, 2006.
- WADE, M. J.; STEVENS, L. Microorganism mediated reproductive isolation in flour beetles (genus *Tribolium*). **Science**. Washington DC, v. 227, p. 527–28, 1985.
- WEEKS, A. R.; BREEUWER, J. A. *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. **Royal Society of London. Proceedings B. Biological Sciences**. London, v. 268, p. 2245–2251, 2001.
- WEEKS, A. R.; TURELLI, M.; HARCUMBE, W. R.; REYNOLDS, K. T.; HOFFMAN, A. A. From Parasite to Mutualist: Rapid Evolution of *Wolbachia* in Natural Populations of *Drosophila*. **PLoS Biology**. San Francisco, v. 5, n. 5, p. 997-1005, 2007.
- WEISBURG, W. G.; DOBSON, M. E.; SAMUEL, J. M.; DASCH, G. A.; MALLAVIA, L. P. Phylogenetic diversity of Rickettsiae. **Journal of Bacteriology**. Washington DC, v. 171, p. 4202–6, 1989.
- WEISS, E.; MOULDER, J. W. Order I. **Rickettsiales Gieszczykiewicz**. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, ed. NR Krieg, JG Holt, Baltimore, p. 687–729, 1984.

- WENSELEERS, T.; ITO, F.; VAN BORM, S.; HUYBRECHTS, R.; VOLCKAERT, F.; BILLEN, J. Widespread occurrence of the microorganism *Wolbachia* in ants. **Royal Society of London. Proceedings B. Biological Sciences**. London, v. 265, n. 1404, p. 1447-1452, 1998.
- WERREN, J. H.; WINDSOR, D. W.; GUO, L. Distribution of *Wolbachia* in neotropical arthropods. **Royal Society of London. Proceedings B. Biological Sciences**. London. v. 262, p. 147–204, 1995.
- WERREN, J. H. Biology of *Wolbachia*. **Annual Review of Entomology**. Palo Alto, v. 42, p. 589-609, 1997.
- WERREN, J. H.; O'NEILL, S. The evolution of heritable symbionts. In *Influential Passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction*. S. O'Neill, A. Hoffman and J.H. Werren, eds, Oxford University Press, 1997.
- WERREN, J. H.; BEUKEBOOM, L. W. Sex determination, sex ratios and genetic conflict. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. Palo Alto, v. 29, p. 233–261, 1998.
- WERREN, J. H.; WINDSOR, D. M. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? **Royal Society of London. Proceedings B. Biological Sciences**. London. v. 267, p. 1277–1285, 2000.
- WERREN, J. H.; BARTOS, J. D. Recombination in *Wolbachia*. **Current Biology**. Cambridge, v. 11, n. 6, p. 431-435, 2001.
- WERREN, J. H.; BALDO, L.; CLARK, M. E. *Wolbachia*: Master Manipulators of Invertebrate Biology. **Nature Reviews Microbiology**. London, v. 6, n. 10, p. 741-51, 2008.
- WEST, S. A.; COOK, J. M.; WERREN, J. H.; GODFRAY, H. C. J. 1998. *Wolbachia* in two insect host-parasitoid communities. **Molecular Ecology**. Oxford, v. 7, p. 1457–1465, 1998.
- WHITE, I. M.; ELSON-HARRIS, M. M. **Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics**. CAB International, Wallingford, 1992.
- WU, M.; SUN, L. V.; VAMATHEVAN, J.; RIEGLER, M.; DEBOY, R.; BROWNLIE, J. C.; MCGRAW, E. A.; MARTIN, W.; ESSER, C. Phylogenomics of the reproductive

- parasite *Wolbachia pipientis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. **PLoS Biology**. San Francisco, v. 2, n. 3, p. 327-341, 2004.
- XI, Z.; KHOO, C. C.; DOBSON, S. L. Wolbachia establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population. **Science**. Washington DC, v. 310, n. 5746, p. 326-328, 2005.
- YEN, J. H.; BARR, A. R. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. **Nature**. London, v. 232, p. 657–58, 1971.
- ZABALOU, S.; RIEGLER, M.; THEODORAKOPOULOU, M.; STAUFFER, C.; SAVAKIS, C.; BOURTZIS, K. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. **National Academy of Sciences. Proceedings**. Washington DC, v. 101, p. 15042-15045, 2004.
- ZABALOU, S.; APOSTOLAK, I. A.; LIVADARAS, I.; FRANZ, G.; ROBINSON, A. S.; SAVAKIS, C.; BOURTZIS, K. Incompatible insect technique: incompatible males from a *Ceratitis capitata* genetic sexing strain. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. West Sussex, v. 132, p. 232–240, 2009.
- ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 1999.
- ZEH, D. W.; ZEH, J. A.; BONILLA, M. M. Wolbachia, sex ratio bias and apparent male killing in the harlequin beetle riding pseudoscorpion. **Heredity**. London, v. 95, n. 1, p. 41-49, 2005.
- ZHOU, W.; ROUSSET, F.; O'NEILL, S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. **Royal Society of London. Proceedings B. Biological Sciences**. London, v. 265, n. 1395, p. 509-515, 1998.
- ZUCCHI, R. A. **Diversidad, Distribución y Hospederos del Género *Anastrepha* en Brasil**. In: V. Hernández-Ortiz (Ed.), *Moscas de la fruta en Latinoamérica (Diptera: Tephritidae): diversidad, biología y manejo*. S y G editores, Distrito Federal. 77-1, 2007.
- ZUCCHI, R. A. 2008. **Fruit flies in Brazil: *Anastrepha* species and their hosts plants and parasitoids**. <http://www.lea.esalq.usp.br/anastrepha/> (último acesso em 01/11/2012)

ZUH, R.; HAMMERSTEIN, P. Still a Host of Hosts for *Wolbachia*: Analysis of Recent Suggests That 40% of Terrestrial Arthropod Species Are Infected. **PLoS ONE**. San Francisco, v. 7, n. 6, p.1, e79825843, 2012.

Anexos

1. Sequências MLST concatenadas

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
1  GAAGCTGCAGAAATGCATGAAAAAATTGAGGCAGATTTTCGCTTACATTGGTTCGTGTGATGGTGATATGGAAAAGGGATCACTTCGTTGTGATGCAAATG
329 .....
330 .....G.....
331 .....
332 .....
333 .....
334 .....
335 .....
336 .....
337 .....
338 .....
339 .....
340 .....
341 .....T.....
342 .....A.....
343 .....
344 .....
345 .....
346 .....
75  A.....A.....A.....G.....
29  A.....A.....A.....
65  A.....A.....
2  .....C.....
13 .....
17 .....C.....
19 .....G.....
12  G.....T.....
73 .....A.....
34 .....A.....
3  T.....C.....A.....G.....C.....

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
1  TTTCGTCCGCCTAAAAGGCAGTAGTACATTTGGCACTCGTTGTGAAATAAAAAATCTGAACTCGATACGTTATATTGTGCAAGCTATAGACTATGAAAT
329 .....
330 .....
331 .....
332 .....
333 .....
334 .....
335 .....
336 .....
337 .....
338 .....
339 .....
340 .....
341 .....
342 .....C.....G.....
343 .....
344 .....T.....
345 .....
346 .....
75  C.....C.....C.....C.....A.....C.....
29  T.....C.....G.....
65  T.....C.....G.....
2  T.....C.....G.....
13 .....
17 .....A.....G.....C.....
19 .....T.....C.....G.....
12 .....C.....G.....
73 .....C.....G.....
34 .....C.....C.....G.....
3  T.....C.....G.....T.....C.....CT.A.T.A.....A.....T.....GC

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
1  ACAAGACAAATTGAAATTTAGAAAGTGGAGAGAAATAGTCAAGATACCTTATTGTTGACGTTGCTTCGGGAAAAACAAAGTGATGAGAGCAAA
329 .....
330 .....T.....
331 .....
332 .....
333 .....
334 .....
335 .....
336 .....
337 .....G.AA.....
338 .....G.AA.....
339 .....G.AA.....
340 .....
341 .....
342 .....T.C.T.....
343 .....
344 .....G.A.....
345 .....
346 .....
75  G.....T.C.T.....C.A.....
29  G.....G.....T.T.....C.A.....
65  G.....G.....T.C.T.....
2  .....T.C.T.....
13 .....
17 .....

```

```

19 .....T.C.T.....C.A...
12 .....G.....G.....T.....C.A...
73 .....T.C.T.G.....C.A...
34 .....G.....T.....T.....
3 .....G.G.CA.....G.....C.....G.....T.CA.TA.....

      310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
1  GAGGATGCAAGCGATTATAGATACTTCCTGAGCCTGATTATTACCTGTTGAGGTAAGCCAGGATAAAATGCGCACAAAAGGAATGTCATTAACTAAGA
329 .....T.TTC.....A.....
330 .....T.....
331 .....
332 .....
333 .....T.....
334 .....
335 .....
336 .....
337 .....
338 .....
339 .....
340 .....
341 .....A.....T.....
342 .....C.....G.....
343 .....
344 .....
345 .....
346 .....
75 .....A.....C.....G.....C.....
29 .....C.....G.....C.....
65 .....A.....C.....G.....
2 .....C.....G.....G.....C.....
13 .....
17 .....G.....G.....C.....
19 .....A.....C.....G.....C.....
12 .....A.....C.....G.....
73 .....C.....G.....
34 .....C.....G.....C.....
3 .....A.T.T.C.....T.....A.....GC.....AA.....A.C.....TG.....C.....C.C.....A.....

      410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
1  TGCCACTGTTTGTGGTCTGTCTTGCTAACAGCATTATGTTGATTGTTGCCTTACCAGTGCTTGCCGGTGCTATAACTATGCTTCTTACTGATCGCAA
329 .....
330 .....
331 .....
332 .....
333 .....
334 .....
335 .....
336 .....
337 .....
338 .....
339 .....
340 .....
341 .....
342 .....
343 .....
344 .....
345 .....
346 .....
75 .....T.....
29 .....T.....
65 .....T.....
2 .....T.....
13 .....
17 .....
19 .....T.....
12 .....
73 .....
34 .....T.....
3 .....A.....T.A.....GT.....A.....G.A.....T.....G.A.....

      510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
1  TATTGGTACTTCCTTTTTTGATCCGCGGTGGCGGCATCCGTGTTATTCAACATCTATTTTGGTTTTTTGGTCATCCAGAAGTTTACGTAATTATT
329 .....
330 .....
331 .....
332 .....
333 .....A.....
334 .....
335 .....
336 .....
337 .....
338 .....
339 .....
340 .....
341 .....
342 .....
343 .....
344 .....
345 .....
346 .....
75 .....G.....A.....
29 .....G.....A.....
65 .....G.....A.....
2 .....G.....A.....
13 .....
17 .....T.....
19 .....
12 .....G.....T.T.C.....T.....
73 .....G.....A.....T.T.C.....T.....
34 .....C.....T.....

```

```

3 .....T.....T.....C..G.....A.....
      610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
1 TTTCTGCATTGGCATCATAAGTCAGGTTGTATCACTTTTCTCAGACCTGTATTGGTTACATAGGGATGGTTTATGCAATGATAGGTATAGCAG
329 .....
330 .....
331 .....
332 .....
333 .....
334 .....
335 .....
336 .....
337 .....
338 .....
339 .....
340 .....
341 .....
342 .....
343 .....
344 .....
345 .....
346 .....
75 .....
29 .....
65 .....T.....
2 .....
13 .....
17 .....
19 .....
12 .....
73 .....
34 .....
3 .....C..A..C.....C..T..G..A.....C..T..A.....T.....
      710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
1 TATTGGCTTTATGGTTGGGCTCACCATATGTTCACTGTTGGGCTTAGTGCTGACGCTGCTGCATTTTGTATCCGAACTCAACCCGCGCTTCGCCTC
329 .....TTT..
330 .....
331 .....
332 .....G..A.....
333 .....
334 .....
335 .....
336 .....
337 .....AG..C.....T..
338 .....
339 .....
340 .....
341 .....A.....
342 .....
343 .....
344 .....
345 .....
346 .....
75 .....T.....C.....A.....
29 .....T.....C.....A.....
65 .....G.....T.....A.....
2 .....T.....
13 .....
17 .....
19 .....A.....A.....T..
12 .....T.....
73 .....T.....
34 .....T.....T.....
3 C.....T.....T.....C..AA..T.....T.....T..A..T.....
      810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
1 TGCTATATTGCTGCACGCAAGGAAAACTACCAAAGATAAAATAGAAACAGCAATAAAAAATGCAACTGGTAACGTTGCTGGAGAAAATTACGAGGAA
329 .....
330 .....
331 .....
332 .....
333 .....
334 .....
335 .....
336 .....
337 .....
338 .....
339 .....
340 .....T.....
341 .....
342 .....T.....T.....
343 .....
344 .....
345 .....
346 .....
75 .....G.....T.....T.....
29 .....T.....T.....T.....
65 .....T.....T.....T.....
2 .....T.....G.....C.....T.....
13 .....
17 .....G.....T..G.....T.....
19 .....
12 .....
73 .....
34 .....G..A.....G.....G..T..A.....
3 .....C.....G..A.....G.....G..T..A.....
      910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000

```


1 ATCCAATATGAAGGTCATGGGCCCTTCTGGCACTGCACCTCATTGTCCATGTTTTGACTAATAATCGCAACCGAACTGCTTCTGAGGTACGTTATATATTTT
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342 C . C CC C . C T
343
344
345
346
75 . A C CC C . C T C
29 C CC C . C T C
65 T CC C . C T C
2 A CC C . C T C
13
17
19
12 . A T CC C . C T C
73 . A C CC C . C T C
34 . A CC C . C T C
3 . A CTGC . A TG T C . C . . . A A C

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
1 CTCGCAAGGGTGGAAACTTGGGAGAAACAGGAAGTGTAGTTACCTTTTCGATCATGTAGGCTTAATCGTCTATAAAGCAGAGGGTGTGAATTTTGATGA
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342 A
343
344
345
346
75 . T . A A
29 . T . A A
65 T T
2
13
17 T . A C C
19 T . A T . A C C
12 T . A T . A A A C
73 T . A T . A C A A C
34 T . A T . A C A A C
3 A . C . T . T T G T A G A . A A

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
1 TTTATTTCAGTCATGGAATCGAATTAGAAGTATTGAATGTTGAGGAAATGACAAAGAAGGATTACACGTTATAACTTGTGAAATAAAGATTTTGATAA
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342 T . A . T G G C C
343 A C C C
344
345
346
75 T . A G G
29 T . A . T G G
65 T . A . T G G
2 T . A . T G T
13
17
19
12
73
34
3 T . ACT T A A T . T G GC

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
1 GTACCGATGCCTTTGGTGGTACTGGAACCGGTGCAGCACCGGTAATTGCAAAAGCAGCCAGAGAAGCAAGAGCCGAGTTAAGGATAGACCGCCAAAG
329
330
331
331
331

332
 333
 334 TC
 335
 336
 337
 338
 339
 340
 341
 342 TT
 343
 344
 345 C TC A
 346 T
 75 C A T G
 29 T
 65 T
 2 G G
 13
 17
 19
 12 T
 73
 34
 3 T . C . T . C A . C . T A G . T A G A G

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400

1 AAAAAAGATATTGACTGTTGGAGTTGTAACATAAACCGTTTCGGTTTTGAAGGTGTGCCCGGTATGCGCATTGCGAGCTTGGACTTGAAGAACTGCCAAA
 329
 330
 331
 332
 333
 334
 335
 336
 337
 338
 339
 340
 341
 342
 343
 344
 345
 346
 75 C G G
 29 C
 65 C
 2 C
 13
 17
 19
 12
 73 C
 34
 3 C G A GT

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500

1 ATACGTGGATACACTTATTGTCATTCCAATCAGAATTTATTAGAATTGCAAATGAAAAACTACATTTCTGATGCATTTAACTTGCTGATAATGTT
 329
 330
 331
 332
 333
 334
 335
 336
 337
 338
 339
 340
 341
 342
 343
 344
 345
 346
 75
 29
 65
 2
 13
 17
 19
 12
 73 C
 34
 3 A T A T . C . G G C C C

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600

1 CTGCACATTGGCATCAGAGGAGTAACAGACTTGATGGTCATGCCAGGGCTTATTAACTTGACTTCGCTGATATAGAACAGTAATGAGCGAGATGGGCA
 329
 330 C
 331 C
 332 C
 333
 334 C
 335 C A

```

336 .....C.....A.
337 .....C.....A.
338 .....C.....G.
339 .....C.....A.
340 .....C.....A.
341 .....
342 .....C.....
343 .....
344 .....
345 .....C.....
346 .....C.....
75 .....T.....
29 .....T.....
65 .....T.....T.
2 .....T.....
13 .....C.....
17 .....C.....
19 .....C.....
12 .....T.....C.
73 .....
34 .....T.A.....A.....A.G.....C.....T.T.....T.
3 .....T.A.....T.A.....A.G.....T.T.....T.T.....

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
1 AAGCGATGATCGGCACCGGAGAGGCAGAGGAGAAGATAGAGCAATTAGTGCCTGGAATGCTCCCACTTATTTGAAACTTAATAGTTCCAACCTTTTACA
329 .....
330 .....
331 .....T.....
332 .....T.....T.....
333 .....
334 .....
335 .....
336 .....
337 .....
338 .....
339 .....
340 .....
341 .....
342 .....
343 .....
344 .....
345 .....
346 .....
75 .....C.....
29 .....A.....CC.....C.....
65 .....G.....C.....C.....
2 .....T.....C.....
13 .....C.....
17 .....
19 .....
12 .....C.....C.....
73 .....C.....T.....C.....
34 .....C.....
3 .....A.T.T.T.....G.....A.....G.....G.T.....C.G..

1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
1 TTCAAAGGATCTAACCTCTGATCAGGCAATAACCTCTTCTGTGAAAGATGCGCTGCGTTGGGATGCTTAGCTGTCGGATTTACTATATATACCTGTTCT
329 .....
330 .....
331 .....
332 .....
333 .....
334 .....
335 .....
336 .....
337 .....
338 .....
339 .....
340 .....T.C.....
341 .....
342 .....
343 .....
344 .....
345 .....
346 .....
75 .....AA.G.T.....A.....A.....C.G.T.....
29 .....A.G.T.....A.....A.....C.G.T.....
65 .....G.AA.G.T.....A.....A.....C.G.T.....
2 .....AA.G.T.....A.....A.....C.G.T.....
13 .....
17 .....G.A.G.T.....C.....
19 .....C.....
12 .....G.A.G.T.....A.....A.....C.G.T.....
73 .....G.A.G.T.....A.....A.....C.G.T.....
34 .....G.A.G.T.....A.....A.....C.G.T.....
3 C.G.AA.CT.T.....A.....TG.....A.....T.G.....T.G.....

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
1 GCTAAGTGTTCGATATGATGGAGGAGCCCGTGGAAATCATAGCTGAAGCCAAATCTTATGGACTTGCAGTAGTGCTATGGTCTTATCCACGCGGTGAAG
329 .....
330 .....
331 .....
332 .....
333 .....
334 .....
335 .....
336 .....
337 .....
338 .....
339 .....

```

```

340 .....
341 .....
342 .....
343 .....
344 .....
345 .....
346 .....
75 .....T.....A.....A.....G.....G.....T
29 .G.....T.....A.....A.....G.....G.....T
65 .....T.....A.....A.....G.....GA.....T
2 .....T.....A.....A.....G.....G.....
13 .....
17 .....G.....
19 .....A.....G.....
12 .....A.....A.....G.....G.....T
73 .....A.....A.....G.....G.....T
34 .....A.....A.....G.....G.....T
3 .....C.....A.....T.C.A..T.....G..T..G..GC..C..C..T

```

```

.....1910.....1920.....1930.....1940.....1950.....1960.....1970.....1980.....1990.....2000
1 GGATTTCCAAAGGAGGGTGAACAGCAGTTGATGTTATTGCCTATGCTGCCACATGGCAGCTTTGCTTGGCGCTAATATAATAAAAGTAAACTTCCAC
329 .....
330 .....
331 .....
332 .....
333 .....
334 .....
335 .....
336 .....
337 .....
338 .....
339 .....
340 .....
341 .....
342 .....
343 .....
344 .....
345 .....
346 .....
75 .A.....A.....A.....A.....C
29 .A.....A.....A.....A.....C
65 .A.....A.....A.....A.....C
2 .A.....A.....A.....A.....C
13 .....
17 .A.....A.....A.....A.....
19 .A.....G.....A.....A.....
12 .A.....G.....A.....A.....G
73 .A.....G.....A.....A.....T.....G
34 .A.....G.....A.....A.....
3 .A.....C.....A.....A.....C.....T

```

```

.....2010.....2020.....2030.....2040.....2050.....2060.....2070
1 TAAATATTGGAAAGGGAGAAAATAGAAACAGAAAATATTGAATCATTACTAAAAGAATTGAATATGTTAAAAGTCT
329 .....
330 .....G.....C
331 .....
332 .....
333 .....
334 .....
335 .....
336 .....
337 .....
338 .....
339 .....
340 .....
341 .....
342 .....
343 .....GG
344 .....G
345 .....G
346 .....T
75 .....T.....A
29 .....G.....A.....A
65 .....A.....A
2 .....A.....A
13 .....
17 .....
19 .....C.....A
12 .....A
73 .....A
34 .....A
3 .....C.....G.....A

```

2. Secuencias wsp

```

.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100
1 ACAAAGTTGATGGTATT-ACCTATAAGAAAGACAAGAGTG-----ATTACAGTCCATTA-AAACCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCA
13 .....
640 .....T
648 .....T
649 .....
31 .....
659 .....
642 .....
643 .....
658 .....T..CC
644 .....
650 .....

```

```

651 .....
652 .....G.....
641 .....CC.....
656 .....C.....
655 .....A.....
23 .....
657 .....
653 .....T...G...G.....G.....G...C.A...C.....
654 .....TC.....
645 .....
647 .....
646 .....
11 .....T.....G.G.....G
16 .....A...A...-GAA...A.G.C.CAGACA-----T.C.T.A...G.....
28 .....A.....AAA.GCAGC..G..AGAAA-----GG.T...C...G.....
39 .....AA.GT.A.C.G..AGAAA-----GG.T...C...G.....G
45 .....A.C.....G.AA.GC.TC.G.T...-GAAA-----A.T...C...G.....G...A.....G
18 .....GC...AGG.GCT..A.G...C..CGGATACTGATACA.C...T.A.T...T...G.T...G.....
38 .....A.....G...AGG.CTT..A.G.A.C..GAGTACAGCCGAC.C...T.ATTG.C..CG.T...C.....
2 .....AA..GCA.C..GT..AGAAA-----GG.T...C...C.AG.....

      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
1 | TTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTTTATTTCATACCTAAACAAAATGATGTTAAAGATGTAGTATTACCCCA--GCAG
13 | .....A.....GA.....A.....
640 | .....C.....A.....AC...GA.....A
648 | .....AC...GA.....A
649 | .....T.....AC...GA.....A
31 | .....AC...GA.....A
659 | .....T.....AC...GA.....A
642 | .....AC...GA.....A
643 | .....AC...GA.....A
658 | .....AC...GA.....A
644 | .....AC...GA.....A
650 | .....C.....AC...GA.....A
651 | .....AC...GA.....A
652 | .....C.....AC...GA.....A
641 | .....AC...GA.....A
656 | .....AC...GA.....A
655 | .....AC...GA.....A
23 | .....AC...GA.....A
657 | .....AC...GA.....A
653 | .....T.....C.....AC...GA.....A
654 | .....C.....C.....C...AC...CGA.....A
645 | .....AC...GA.....A
647 | .....AC...GA.....A
646 | .....AC...GA.....A
11 | .....C...AA...G.....
16 | .....GC...C.G.....C.G.C.C...A.....
28 | .....T.....T.....C.....GC...C.GT.G.GT..G.....C.AC.A.A.AA...GT.T---AGA
39 | .....C.T.....T.A.....GC...C.C.GT.G.T..G.....C.CC.A.A.AA.G.GT.T---AGA
45 | .....C.T.....T.A.....GC...C.C.AT.G.T..G.....C.AC...A.GC.TA.T---AGA
18 | .....A.....GC...GC.G...G..GG.ACAC...CTCC...T---A
38 | .....T.....T.....A.....GA.....GG...T..G.AC.AACGT.AC..G.ACTGC.GT...CGG...
2 .....T.....T.....T.A.....GC...C..C.AT.GGCT..G.....C.....AA...TT.T---A.A

      210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
1 | ATACTATTGCGAACAGTTTACAGCAATTCAGGACTAGTTAACGTTTATTACGATATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATATGTTGGTGTGG
13 | .....AG...G...T...G...G...CA.....
640 | .....AG...G...T...G...G...CA.....
648 | .....AG...G...T...G...G...CA.....
649 | .....AG...G...T...G...G...CA.....
31 | .....AG...G...T...G...G...CA.....
659 | .....AG...G...T...G...G...CA.....
642 | .....AG...AA...T...G...G...CA.....
643 | .....AG...G...T...G...G...CA.....
658 | .....AG...G...T...GG...G...CA.....
644 | .....AG...G...T...G...G...CA.....
650 | .....AG...G...T...G...G...CA.....
651 | .....AG...G...T...G...G...CA.....
652 | .....AG...G...T...G...G...CA.....
641 | .....AG...G...T...G...G...CA.....
656 | .....AG...G...T...G...G...CA.....
655 | .....AG...G...T...G...G...CA.....
23 | .....AG...G...T...G...G...CA.....
657 | .....AG...G...T...G...G...CA.....
653 | .....AG...G...T...G...G...CA.....
654 | .....AG...G...T...G...G...CA.....
645 | .....AG...G...T...G...G...CA.....
647 | .....AG...G...T...G...G...CA.....
646 | .....AG...G...T...G...G...CA.....
11 | .....AG.....A.....
16 | .....G...AG.....G.....
28 | CA.A.G...AG.....T.....T.....
39 | CA.A.G...AG.....T.....GT.....CA.....
45 | CA.G.C...AG.TG..G...GT...T.G...G...CA.....
18 | .....AG.....T.....T.....
38 | .....AG.A.....T.....G...G...CA...C...
2 | TA.A.G...AG.....T.G...G...C.....

      310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
1 | TGTGGTGCAGCGTATGTCAGCACTCCTTTGAAAACCG--CTATAAATAATCAAACAGTAAATTTGGTTTGGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTGAGC
13 | .....A.T.....G.C...G.G...A.....T.T
640 | .....A.T.....G.C...G.G...A.....T.T
648 | .....A.T.....G.C...G.G...A.....T.T
649 | .....A.T.....G.C...G.G...A.....T.T
31 | .....A.T.....G.C...G.G...A.....T.T
659 | .....A.T.....G.C...G.G...A.....T.T
642 | .....A.T.....G.C...G.G...A.....T.T
643 | .....C.....A.T.....G.C...G.G...A.....T.T
645 | .....A.T.....G.C...G.G...A.....T.T
647 | .....A.T.....G.C...G.G...A.....T.T
646 | .....A.T.....G.C...G.G...A.....T.T

```

```

644 .....A.T.....G.C....G.G..G.....A.....T.T
650 .....A.T.....G.C....G.G..G.....A.....T.T
651 .....A.T.....G.C....G.G..G.....A.....T.T
652 .....A.T.....G.C....G.G..G.....A.....T.T
641 .....A.T.....G.C....G.G..G.....A.....T.T
656 .....A.T.....G.C....G.G..G.....A.....T.T
655 .....A.T.....G.C....G.G..G.....A.....T.T
23 .....A.T.....G.C....G.G..G.....A.....T.T
657 .....A.T.....G.C....G.G..G.....A.....T.T
653 .....A.T.....G.C....G.G..G.....A.....T.T
654 .....A.T.....G.C....G.G..G.....A.....T.T
645 .....A.T.....G.C....G.G..G.....A.....T.T
647 .....A.T.....G.C....G.G..G.....A.....T.T
646 .....A.T.....G.C....G.G..G.....A.....T.T
11 .....A.T.....GA....G.G..G.....A.....T.T
16 .....A.T.....GA....G.G..G.....A.....T.T
28 C.....A.A...A...CA.GG.T.ATG.AG.T.GG...GGG...TA...C...T.T
39 C.....A.A...A...CA.GGT.ATG.AG.T.GG...GGG...C...TA...C...T.T
45 .....A.A...A...CA.GG.T.GTG.AG.T.GGG...GG...C...TA...C...T..
18 .....A.T...A...GC....G.G..G.....TG...C...C.G...C.G...
38 .....A.A.A.A...AGC...AAAGT..CTGG.G.A..G.TTC.GG...G...TA...C...T..
2 .....A.A...A...CA..G.TAATGAAG.T.AG...AG...TA...C...T..

```

```

          410          420          430          440          450          460          470          480          490          500
1  |TATGATGTAAGTCCAGAAAGTCAAACCTTTATGCTGGAGCTCGTTATTTCGGTCTTTGGTGCTCACTTTGATAGCG-----AAACTACTGGTG
13 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
640 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
648 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
649 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
31 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
659 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
642 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
643 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
658 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
644 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
650 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
651 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
652 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
641 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
656 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
655 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
23 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
657 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
653 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
654 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
646 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
11 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
16 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
28 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
39 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
45 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
18 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
38 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
2 |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

```

          510          520          530          540          550
1  |CAGATAA-----CAAAAAAGTAGTTACCAAGATGCATACAAAG-----TT
13 |GT.GA..AGAAAC-----CAC..A....C...T.....|
640 |.TA.A..TTCAAC.GG.C.G.CT.C.GATGC..GC.....|
648 |.TA.A..TTCAAC.GG.C.G.CT.C.GATGC..GC.....|
649 |.TA.A..TTCAAC.GG.C.G.CT.C.GATGC..GC.....|
31 |.TA.A..TTCAAC.GG.C.G.CT.C.GATGC..GC.....|
659 |.TA.A..TTCAAC.GG.C.G.CT.C.GATGC..GC.....|
642 |.TA.A..TTCAAC.GG.C.G.CT.C.GATGC..GC.....|
643 |.TA.A..TTCAAC.GG.C.G.CT.C.GATGC..GC.....|
658 |.TA.AG.TTCAAC..G.C.G..TAC.GATGC..GC.....|
644 |.TA.AG.TTCAAC..G.C.G..TAC.GATGC..GC.....|
650 |.TA.AG.TTCAAC..G.C.G..TAC.GATGC..GC.....|
651 |.TA.AG.TTCAAC..G.C.G..TAC.GATGC..GC...C...|
652 |.TA.AG.TTCAAC..G.C.G..TAC.GATGC..GC...C...|
641 |.TA.AG.TTCAAC..G.C.G..TAC.GATGC..GC.....|
656 |.TA.AG.TTCAAC..G.C.G..TAC.GATGC..GC.....|
655 |.TA.AG.TTCAAC..G.C.G..TAC.GATGC..GC.....|
23 |.TA.AG.TTCAAC..G.C.G..TAC.GATGC..GC.....|
657 |.TA.AG.TTCAAC..G.C.G..TAC.GATGC..GC.G...T...|
653 |.TA.AG.TTCAAC..G.C.G..TAC.GATGC..GC.....|
654 |.TA.AG.TTCAAC..G.C.G..TAC.GATGC..GC.....|
645 |.TA.AG.ATCAAC..G.C.G..TAC.GATGC..GC.....|
647 |.TA.AG.AACAAC..G.C.G..TAC.GATGC..GC.....|
646 |.TA.AG.TTCAAC..G.C.G..TAC.GATC..GC.....|
11 |..GC...-----AGA...GG.A.CT.....|
16 |..AGC...-----AGA...G.GG.A.CT.....|
28 |.TA.AG-----CGATGCT..AATCA.A...|
39 |T.A.AG.T-----CCCT.AT...GAG-----|
45 |-----CAACT...-----CCGATGCC.GAATCA.AGG...|
18 |..AGC...-----AGA...G.GG.A.CT.....|
38 |-----C..CTAAAGA.G.T.CC.G.AT...-----C
2 |-----GAT.CT.G.ATCA.A..T-----|

```