

RODRIGO DE OLIVERIA MASCARENHAS

**Endossimbionte *Wolbachia* em moscas-das-frutas do
gênero *Anastrepha* (Tephritidae) e em vespas parasitóides
(Braconidae) associadas**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos para obtenção
do Título de Mestre em Ciências, na área
de concentração Biologia/Genética.....

São Paulo
2007

RODRIGO DE OLIVERIA MASCARENHAS

**Endossimbionte *Wolbachia* em moscas-das-frutas do
gênero *Anastrepha* (Tephritidae) e em vespas parasitóides
(Braconidae) associadas**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos para obtenção
do Título de Mestre em Ciências, na área
de concentração Biologia/Genética.....

Orientadora: Profa. Dra. Denise Selivon-Scheepmaker

São Paulo
2007

Mascarenhas, Rodrigo de Oliveira

Endossimbionte *Wolbachia* em moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* (Tephritidae) e em vespas parasitóides (Braconidae) associadas, 54p.

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

1. *Anastrepha* 2. bactéria 3. Diptera. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

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

Aos meus pais.

“It’s a rather startling proposal that bacteria, the organisms which are popularly associated with disease, may represent the fundamental causative factor in the origin of species.”

Ivan E. Wallin, 1927

AGRADECIMENTOS

A Dra. Denise Selivon Scheepmarker, pela orientação, paciência, incentivo e compreensão ao longo da execução deste trabalho. Além do apoio e incentivo nos momentos de dúvida quanto a carreira profissional.

Ao Dr. André Luiz Paranhos Perondini, pela colaboração e pelos incentivos dados nos momentos decisivos no início, meio e fim do desenvolvimento deste trabalho.

A Keiko Uramoto, técnica do Laboratório de Moscas-das-Frutas, pela identificação das espécies de *Anastrepha* e pelas valiosas dicas relacionadas à identificação dos braconídeos.

Ao MSc. Peterson Lázaro Lópes pelas sugestões nos usos de comandos do POY e nas montagens das árvores de consenso.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Evolutiva e Desenvolvimento de Insetos: Adriana, Camila, Fabiana, Felipe, Janaína, Leandro, Lincoln, Roberto, Rominy e Thaís, pela ajuda em diversos momentos deste trabalho.

A Elzi pela ajuda, nas coletas, na manutenção do material biológico e pelas longas conversas durante os intervalos entre os experimentos.

A minha família, Antonio, Gildenise, Renata e Ricardo, pelo carinho e apoio emocional dado durante estes anos.

Aos amigos da República: Ana Carolina, David, Elisa, Rhavena e Sheila, e aos que freqüentemente nos visitavam: Leandro (Gaio), Maurício, Rafael (Carioca), Renata, pelos momentos que passamos juntos e em que, recorrentemente, conversávamos sobre nossos projetos e trocávamos sugestões.

A “Turma do Bandeirão” pela agradável companhia e longas conversas no intervalo maior dos nossos trabalhos diários.

A grande amiga MSc. Odana Palhares, que mesmo atuando em uma área não afim, demonstrou grande interesse em acompanhar os rumos deste trabalho em suas diferentes etapas, sempre compreendendo perfeitamente do que tudo se tratava.

E a todos aqueles que foram importantes nesta fase e que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

Trabalho realizado com o apoio financeiro do
CNPq (bolsa de Mestrado, proc.132673/2004-5) e
Projeto Temático, FAPESP (proc. 03/02698-3)

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
II. OBJETIVOS	8
III. MATERIAIS E MÉTODOS	9
Coleta e manutenção do material biológico.....	9
Identificação das moscas-das-frutas e dos parasitóides associados.....	9
Preparação do material para análise molecular.....	9
Extração do DNA total.....	11
Detecção da presença de <i>Wolbachia</i> através de PCR.....	12
Eletroforese.....	13
Seqüenciamento e avaliação de consensos.....	13
Clonagem de fragmentos amplificados por PCR.....	14
Extração de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina.....	14
Construção de árvores filogenéticas.....	15
IV. RESULTADOS	18
Detecção e caracterização de linhagens de <i>Wolbachia</i>	18
Linhagens de <i>Wolbachia</i> encontradas em espécies de <i>Anastrepha</i>	23
Linhagens de <i>Wolbachia</i> encontradas em espécies de braconídeos.....	23
Congruência das linhagens de <i>Wolbachia</i> entre espécies de <i>Anastrepha</i> e braconídeos associados.....	24
Comparação das seqüências obtidas com outras depositadas em banco de dados.....	25
Análises filogenéticas.....	25
V. DISCUSSÃO	36
VI. CONCLUSÕES	42
VII. RESUMO	44
VIII. SUMMARY	45
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
X. ANEXOS	54

I. INTRODUÇÃO

A bactéria descrita por HERTIG & WOLBACH (1924) somente foi definida como *Wolbachia pipientis* após doze anos (HERTIG, 1936). Foram noticiadas como bactérias semelhantes a “rickettsia” encontradas no citoplasma de células germinativas do mosquito *Culex pipiens*. Nesse mesmo trabalho, o modo de transmissão vertical (através dos ovos) também foi sugerido. Mais de três décadas após essa descrição, o termo incompatibilidade citoplasmática (IC) foi cunhado por Laven (revisado por LAVEN, 1967) que estava trabalhando com diferentes populações de *Culex pipiens* e encontrou incompatibilidade unidirecional e bidirecional nos cruzamentos entre as diferentes amostras do mosquito. Além disso, experimentos de retrocruzamentos com os descendentes híbridos mostraram que essa incompatibilidade estava associada a um fator herdado maternamente. A conexão entre as duas descobertas só ocorreu anos mais tarde quando YEN & BARR (1971) indicaram que a incompatibilidade observada nos cruzamentos de *C. pipiens* poderiam estar associadas às bactérias de herança materna descritas por Hertig. Os dois autores demonstraram sua hipótese removendo as bactérias através do tratamento dos mosquitos com o antibiótico tetraciclina, observando que juntamente à eliminação das bactérias, ocorria o desaparecimento do fenômeno de IC.

Bactérias do gênero *Wolbachia* são endossimbiontes que infestam uma grande variedade de artrópodes (WERREN *et al.*, 1995a) assim como alguns nematódeos (SIRONI *et al.*, 1995). Herdadas verticalmente (transmissão através dos ovos da fêmea para a prole), elas infestam tanto os tecidos reprodutivos como os somáticos de seus hospedeiros (DOBSON *et al.*, 1999). Essas bactérias posicionam-se filogeneticamente como grupo-irmão de *Ehrlichia* que, por sua vez, é grupo-irmão das *Rickettsia*. O agrupamento que comporta estas bactérias é definido como “bactérias semelhantes a *Rickettsia*”, que são bactérias (exceto *Wolbachia*) patogênicas à vertebrados e que têm insetos como hospedeiros intermediários (ANDERSON & KARR, 2001). *Wolbachia*, portanto, distingue-se das outras bactérias deste grupo monofilético, por não ter vertebrados como hospedeiros, assim como

pela capacidade de causar alterações no modo reprodutivo de seus hospedeiros. Estas manipulações incluem a indução de partenogênese em alguns Hymenoptera (STOUTHAMER *et al.*, 1993), feminização de machos genéticos em Isopoda (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) e em Diptera (HURST, *et al.*, 2000), além de incompatibilidade citoplasmática em diversas ordens de insetos (WADE & STEVEN., 1985; BREWER *et al.*, 1992; O'NEILL *et al.*, 1992). Devido a estas alterações, inúmeras especulações vêm sendo feitas acerca do papel potencial dessas bactérias em processos de especiação nos seus hospedeiros (WERREN, 1997; ROKAS, 2000; CHARLAT *et al.*, 2003).

A partir da segunda metade da década de 1990, foi demonstrado haver um alto grau de infestação por *Wolbachia* em artrópodes de regiões distintas. Entre insetos, amostrados no Panamá, América do Norte, Inglaterra e na Indonésia (WERREN *et al.*, 1995b; WEST *et al.*, 1998; WERREN & WINDSOR, 2000; KITTAYAPONG *et al.*, 2000a) foram observados índices de infecção variando entre 20 e 60% das espécies. No Brasil, LAVAGNOLLI *et al.* (2005) encontraram 45% de infecção numa amostragem de insetos de uma área de mata no litoral norte do Estado de São Paulo. Esses resultados mostram que existe um relativo equilíbrio entre o grau de infecção nos diferentes continentes, como havia sido proposto por WERREN & WINDSOR (2000).

A transmissão de *Wolbachia* ocorre verticalmente entre indivíduos de mesma espécie através da célula-ovo da fêmea infectada para sua progênie. No entanto, a habilidade de *Wolbachia* invadir populações de hospedeiros não explica o alto número de espécies que são infectadas. Como discute VAVRE *et al.* (1999), as alterações nos sistemas reprodutivos dos hospedeiros podem explicar como essas bactérias se fixam nos novos hospedeiros, mas não explicam como a *Wolbachia* chega até esses novos hospedeiros. Análises filogenéticas das *Wolbachia* existentes em diversos hospedeiros mostram que essa bactéria pertence a um grupo monofilético das alfa-proteobactérias e aquelas que infestam artrópodes, são agrupadas em duas subdivisões, A e B, que divergiram há 50 milhões de anos

(WERREN *et al.*, 1995b). A filogenia das linhagens de *Wolbachia* em geral não se justapõe à filogenia de seus hospedeiros, mas esta associação é observada em alguns casos específicos. Entretanto, devido à ampla distribuição nos artrópodes, WERREN & O'NEILL (1997) consideraram que a transmissão horizontal (transferência intertáxons) destas bactérias entre as espécies hospedeiras deve ocorrer muito freqüentemente.

Suporte experimental a essa hipótese foi obtido pela transmissão artificial através da microinjeção de citoplasma de ovos de linhagens infectadas pela *Wolbachia* para ovos de linhagens não-infectadas entre espécies próximas, por exemplo em *Drosophila simulans* e *D. melanogaster* (BOYLE *et al.*, 1993), entre as moscas-das-frutas *Rhagoletis cerasi* e *Ceratitidis capitata* (ZABALOU *et al.*, 2004) e até mesmo entre espécies de diferentes famílias, de uma linhagem de *Drosophila simulans* para o mosquito *Aedes albopictus* (BRAIG *et al.*, 1994).

Em condições naturais, acredita-se que a transferência destas bactérias entre táxons poderia acontecer entre organismos ecologicamente relacionados, tais como aqueles habitando o mesmo microambiente, participando de relação presa-predador, parasita-hospedeiro e parasitóide-hospedeiro. Por exemplo, ao ingerir um ou parte de um hospedeiro infectado por *Wolbachia*, a infecção poderia ser adquirida pelo parasita via passagem pelo trato digestivo (WEST *et al.*, 1998).

A situação de organismos que habitam o mesmo microambiente foi estudada por RIGAUD & JUCHAULT (1995). Esses autores realizaram experimentos com o crustáceo *Armadillium vulgare*. Retirando um pereiópodo destes animais, os autores conseguiram promover uma injúria com exposição de hemolinfa e depois disso, promoveram o contato entre dois indivíduos diferentes quanto ao *status* de infecção. Ao utilizar, nesses experimentos, fêmeas infectadas e machos livres de infecção observaram que os indivíduos não-infectados passavam a apresentar fenótipos de indivíduos infectados. Aliado a esse experimento, os autores realizaram ainda observações de campo e perceberam que esses animais encontram-se comumente em populações de alta densidade e algumas vezes, mais de uma espécie ocorre em uma pequena área. Dentre os animais encontrados em seus ambientes naturais, percebeu-se que existe uma freqüência de aproximadamente 10% de indivíduos com

injúrias, tais como ausência de antenas, de pereiópodos ou de presença de cicatrizes no exoqueleto. A conclusão foi que existe nas populações naturais destes organismos condições para o contato de hemolinfa entre indivíduos infectados e não-infectados, indicando que a transferência horizontal da *Wolbachia* é possível, como haviam demonstrado em laboratório.

DEDEINE *et al.* (2005) descreveram outra situação, reforçando a idéia de transferência horizontal entre espécies que habitam ambientes próximos. Neste trabalho, por meio de construção de árvore filogenética entre linhagens de *Wolbachia* encontradas em formigas, observaram que linhagens muito aparentadas ocorrem em pares de espécies que convivem em um mesmo ninho. Dado o íntimo contato entre a espécie inquilina e a hospedeira, por exemplo, alimentação por trofalaxia e carregamento de ovos pela operária, os autores veem, nessa relação, oportunidade suficiente para a transferência das bactérias entre as espécies em questão.

De modo análogo, encontraram-se evidências para a transferência de bactérias entre espécies através de predação em ácaros (JOHANOVICZ & HOY, 1996), assim como em comunidade de organismos em plantações de arroz (KITAYAPONG *et al.*, 2003).

Outra situação possível refere-se aos parasitóides. Parasitóide é uma denominação dada a insetos que colocam seus ovos no interior do corpo de um outro animal, normalmente outro inseto, onde suas larvas se desenvolvem alimentando-se do hospedeiro (GODFRAY, 1994). Compreendem cerca de 25% de todas as espécies de insetos e atacam uma enorme variedade de táxons de artrópodes (O'NEILI *et al.*, 1992). Devido ao peculiar hábito de vida desses parasitas, eles são excelentes candidatos a serem vetores de linhagens de *Wolbachia* na transmissão entre táxons (WERREN *et al.*, 1995b). As larvas dos parasitóides seriam contaminadas ao ingerir os tecidos do hospedeiro e, juntamente, as bactérias que o infectam. Uma outra possibilidade seria a transmissão de bactérias contidas nos ovos do parasitóides para os seus hospedeiros (WEST *et al.*, 1998; COURDAUX *et al.*, 2001).

Investigações de associações de parasitóides e seus hospedeiros, baseadas em estudos de filogenia molecular de regiões variáveis de genes de *Wolbachia*, em

populações naturais infectadas, sugerem fortemente que deve ocorrer a transmissão horizontal dessas bactérias entre esses organismos (SCHILTHUIZEN & STOUTHAMER, 1997; VAN MEER *et al.*, 1999; VAVRE *et al.*, 1999; NODA *et al.*, 2001). No entanto, alguns outros estudos mostram dados conflitantes (SCHILTHUIZEN & STOUTHAMER, 1998; WEST *et al.*, 1998; SHOEMAKER *et al.*, 2002).

Demonstração experimental da transmissão de *Wolbachia* do hospedeiro para o parasitóide foi obtida por HEATH *et al.* (1999), que colocaram fêmeas não-infectadas da vespa parasitóide *Leptopilina boulardi* para depositar ovos em *Drosophila simulans*, uma espécie hospedeira infectada com *Wolbachia*. Na geração seguinte de vespas, foi possível observar a incidência das bactérias que, além disso, mantiveram-se nas futuras gerações, mesmo na ausência de novos ovos hospedeiros infectados. Através desse experimento, foi possível demonstrar que é plausível a transferência horizontal destas bactérias entre espécies que tenham relações ecológicas que favoreçam essa transmissão.

Além de espécies do gênero *Drosophila*, foram encontradas muitas outras espécies de Diptera infectadas por *Wolbachia*, entre elas a mosca-das-frutas, *Anastrepha suspensa* (WERREN *et al.*, 1995a), um tefritídeo não identificado (WERREN & WINDSOR, 2000), bem como populações européias de *Rhagoletis cerasi* (RIEGLER & STAUFER, 2002), sete espécies do gênero *Bactrocera* e em *Dacus destillatoria* (KITAYAPONG *et al.*, 2000b).

No Brasil, SELIVON *et al.* (1996) observaram que embriões da mosca-das-frutas *Anastrepha* sp.2 *aff. fraterculus*, coletada no estado de São Paulo, possuíam uma grande população de bactérias espalhadas pelo vitelo e nas células polares dos embriões. Posteriormente, foi demonstrado por PCR e seqüenciamento do gene *ftsZ* do ciclo celular bacteriano, que essas bactérias endossimbiontes de *A. sp.2 aff. fraterculus* pertencem ao gênero *Wolbachia* e que estas bactérias são encontradas nas células germinativas dos embriões e em todas as etapas do desenvolvimento da linhagem germinativa das fêmeas, inclusive nos ovos maduros das fêmeas adultas, indicando uma transmissão vertical usual destas bactérias nesta espécie (SELIVON *et al.*, 2002). Além da infecção em *A. sp.2 aff. fraterculus*, foram encontrados

recentemente, por PCR de fragmento do gene ribossomal 16S, utilizando iniciadores específicos de *Wolbachia*, bactérias semelhantes em *Ceratitis capitata* (ROCHA *et al.*, 2005). Em um estudo mais recente, COSCRATO (2006) encontrou estas bactérias em 17 espécies de *Anastrepha*. Em *Rhagoletis cerasi* mostrou-se que as bactérias presentes causam incompatibilidade citoplasmática (RIEGLER & STAUFER, 2002) e resultados preliminares mostraram que a incompatibilidade em cruzamentos entre *Anastrepha obliqua* e *A. sp.2 aff. fraterculus* pode ser devido a presença destes microorganismos (SELIVON *et al.*, dados não-publicados).

As moscas-das-frutas pertencem à família Tephritidae (Diptera) que apresenta 4000 espécies descritas e distribuídas em 500 gêneros. Recebem esta denominação devido à fase larval de cerca de 38% do total de espécies se alimentarem dos tecidos vegetais contidos em frutos. O restante das espécies dessa família, em sua maioria, alimenta-se de inflorescências de Asteraceae e um menor número de espécies nutre-se de folhas, ramos ou raízes (WHITE & ELSON-HARRIS, 1994). Dentro desta família encontram-se seis gêneros de grande importância econômica mundial por atacarem frutos de uso comercial, *Toxotrypana*, *Dacus*, *Bactrocera*, *Ceratitis*, *Rhagoletis* e *Anastrepha*. O gênero *Anastrepha*, que é endêmico do continente Americano, ocorrendo do sul dos Estados Unidos e ilhas do Caribe ao centro-norte da Argentina, apresenta cerca de 200 espécies descritas, dentre as quais, 94 ocorrem no Brasil (ZUCCHI, 2000). No Brasil, este gênero congrega as espécies de maior importância econômica.

As moscas-das-frutas no Brasil são parasitadas por vespas pertencentes às famílias Braconidae, Figitidae (Eucolinae) e Pteromalidae, que estão amplamente dispersas no território brasileiro (CANAL & ZUCCHI, 2000; GUIMARÃES *et al.*, 2000). Esses parasitóides atacam, em sua grande maioria, larvas das moscas-das-frutas em estágios finais do desenvolvimento e emergem dos pupários após completarem o seu desenvolvimento.

Pertencente a família Pteromalidae a espécie *Pachycrepoideus vindemiae* foi registrada parasitando *Anastrepha* (CANAL & ZUCCHI, 2000). Mais recentemente as espécies *Splangia gemina* e *S. endilius* foram coletadas em *Anastrepha* que

infestavam frutos de cajá-mirim (*Spondias lutea*) (UCHÔA-FERNANDES *et al.*, 2003).

Dentre os parasitóides de *Anastrepha*, no Brasil foram encontradas onze espécies que pertencem a seis gêneros da família Figitidae (GUIMARÃES *et al.*, 2000).

A família Braconidae é a que contém o maior número de espécies parasitóides de moscas-das-frutas (WHARTON, 1989). Além disso, estudos sobre esses organismos são de grande importância devido serem esses os mais usados em programas de controle biológico de seus hospedeiros (CLAUSEN, 1978). No Brasil, estão registradas atualmente treze espécies de parasitóides braconídeos que atacam uma grande variedade de espécies do gênero *Anastrepha*, entre as quais se destaca a espécie nominal *A. fraterculus*, uma das mais importantes pragas da fruticultura no Brasil (CANAL & ZUCCHI, 2000). Em geral, estas espécies de braconídeos que infestam populações de *Anastrephas* são generalistas, sendo freqüentemente encontradas associadas a uma única espécie hospedeira das moscas-das-frutas (UCHÔA-FERNANDES *et al.*, 2003).

Esses fatos tornam a associação himenópteros/moscas-das-frutas um excelente sistema para estudos das interações entre parasitas-hospedeiros, incluindo aspectos da possível transferência da *Wolbachia* entre diferentes espécies.

II. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo geral, a investigação da presença de bactérias do gênero *Wolbachia* em diferentes populações de algumas espécies de *Anastrepha* e parasitóides da família Braconidae associados, na busca de evidências sobre a existência de transmissão horizontal das bactérias entre esses organismos.

Os objetivos específicos foram

- 1) estudar diferentes populações das moscas-das-frutas e de vespas parasitóides da família Braconidae, quanto à presença e tipo de *Wolbachia*;
- 2) analisar as relações de parentesco entre as bactérias das diferentes populações de espécies hospedeiras;
- 3) analisar a similaridade entre as *Wolbachia* encontradas nos braconídeos e nas espécies de *Anastrepha* parasitadas;
- 4) comparar as linhagens bacterianas encontradas nas amostras estudadas neste trabalho, com linhagens já descritas encontradas em outros organismos hospedeiros.

III. MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e manutenção do material biológico

As espécies estudadas no presente trabalho foram obtidas a partir de frutos infestados coletados no período de junho de 2003 a junho de 2005. Os frutos foram coletados em pomares domésticos em diferentes localidades, conforme listado na Tabela I. Estes frutos foram acondicionados em caixas com vermiculita e levados ao laboratório, onde permaneceram até atingir o estágio de pupa. Após um período de uma a duas semanas, os pupários eram retirados da vermiculita e transferidos para caixas de plástico até a emergência dos adultos. Deste modo, os adultos que emergiram, tanto de moscas-das-frutas como de seus parasitóides, foram armazenados em etanol absoluto e mantidos a uma temperatura de -20° C até serem identificados e processados experimentalmente, como descrito a seguir.

Identificação das moscas-das-frutas e dos parasitóides associados

As espécies de *Anastrepha* obtidas nas coletas foram identificadas pela taxonomista Keiko Uramoto, do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, do Instituto de Biociências, USP. Os braconídeos, por sua vez, foram por nós identificados com base na chave de identificação de CANAL & ZUCCHI (2000).

Preparação do material para análise molecular

Após serem identificados, amostras das espécies coletadas foram submetidos à extração de DNA. Para as espécies de *Anastrepha* foram utilizadas as fêmeas adultas, pois nos daria uma maior certeza quanto à identificação da espécie uma vez que esta é feita, principalmente, com base na extremidade do acúleo do ovipositor (ZUCCHI 2000).

Tabela I. Espécies de *Anastrepha*, braconídeos associados, com respectivos frutos e localidades onde foram coletados.

<i>Anastrepha</i>	Braconidae	Fruto coletado (espécie)	Localidade	Coordenadas geográficas
<i>A. sp.1 aff. fraterculus</i>	<i>D. brasiliensis</i>	(Nêspera) <i>Eriobotrya japonica</i>	Vargem Grande Paulista-SP	S 23° 39' W 46° 59'
<i>A. amita</i>	<i>D. areolatus</i> <i>D. brasiliensis</i> <i>O. bellus</i> <i>U. anastrephae</i>	(Pombeiro) <i>Citharexylum myrianthum</i>	São Paulo-SP	S 23° 32' W 46° 37'
<i>A. obliqua</i>	<i>A. anastrephae</i>	(Carambola) <i>Averrhoa carambola</i>	Caçapava-SP	S 22° 57' W 48° 11'
<i>A. sp.1 aff. fraterculus</i>	<i>D. areolatus</i> <i>D. brasiliensis</i> <i>O. bellus</i> <i>U. anastrephae</i>	(Goiaba) <i>Psidium guajava</i>	São Paulo-SP	S 23° 32' W 46° 37'
<i>A. sp.2 aff. fraterculus</i>	<i>D. areolatus</i> <i>O. bellus</i> <i>U. anastrephae</i>	(Chapéu-de-sol) <i>Terminalia catappa</i>	Boiçucanga-SP	S 23° 47' W 45° 37'
<i>A. obliqua</i>	<i>A. anastrephae</i> <i>D. areolatus</i> <i>O. bellus</i> <i>U. anastrephae</i>	(Carambola) <i>Averrhoa carambola</i>	Indaiatuba-SP	S 23° 05' W 47° 13'
<i>A. montei</i> <i>A. pickeli</i>	<i>D. fluminensis</i>	(Mandioca) <i>Manihot esculenta</i>	Taubaté-SP	S 22° 57' W 45° 38'
<i>A. sp.2 aff. fraterculus</i> *	<i>D. areolatus</i>	(Nêspera) <i>Eriobotrya japonica</i>	Tijucas-SC	S 27° 14' W 48° 37'
<i>A. macrura</i> <i>A. serpentina</i>	<i>D. areolatus</i>	(Burra Leiteira) <i>Ficus organensis</i>	Natal-RN	S 05° 48' W 35° 13'
<i>A. obliqua</i>	<i>D. areolatus</i>	(Manga) <i>Mangifera indica</i>	Lorena-SP	S 22° 44' W 45° 06'
<i>A. obliqua</i>	<i>D. areolatus</i> <i>U. anastrephae</i>	(Manga) <i>Mangifera indica</i>	Bemposta-RJ	S 22° 07' W 43° 05'
<i>A. obliqua</i>	<i>D. areolatus</i> <i>O. bellus</i> <i>U. anastrephae</i>	(Carambola) <i>Averrhoa carambola</i>	Brasília-DF	S 15° 47' W 47° 55'

* Não analisado quanto à presença e identificação de *Wolbachia*.

As fêmeas foram dissecadas imersas em etanol, sendo o abdome isolado para uma posterior extração de DNA e o restante do corpo, inclusive asas e ovipositor, preservados em etanol e armazenados à -20° C para uma posterior verificação. Esse material está armazenado no Laboratório de Biologia Evolutiva de Moscas-das-Frutas no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Um número variável entre 3 e 10 (dependendo do número de indivíduos disponível da amostra) de abdomes por amostra, foram isolados, sendo feita a extração de DNA individualmente para cada um deles.

Para as espécies de parasitóides estudadas, procedemos de maneira semelhante. Porém em alguns casos, machos também foram utilizados. Nesses insetos, as asas são as principais estruturas utilizadas para identificação e com isso, não existe problema na utilização dos machos para os estudos. Devido ao tamanho reduzido destes parasitóides, um número variável de abdomes (1 a 4) foi utilizado em cada extração de DNA e várias extrações feitas para cada uma das amostras populacionais. O restante dos corpos desses indivíduos está armazenados, conforme acima descrito.

Os abdomes dissecados foram armazenados em etanol à -20° C até o momento da extração de DNA, período que nunca excedeu uma semana.

Extração de DNA total

As amostras preservadas em etanol, foram submetidas ao protocolo adaptado de JOWETT (1986) para extração de DNA total. Os tecidos foram macerados, com o auxílio de pistilos plásticos estéreis, em tubos de polipropileno de 1.5ml, em uma solução de homogenização [Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 60 mM, EDTA 50 mM]. Em seguida, adicionou-se o mesmo volume de uma segunda solução [SDS 1,25 %, Tris-HCl 0,3 M (pH 9,0), EDTA 0,1 M, sacarose 5 %, proteinase K (à concentração final de 100 μ g/ml)]. A mistura foi incubada por 1 hora a 65° C para o rompimento dos tecidos e membranas celulares, além da digestão de proteínas pela proteinase K. Após esta incubação, foi adicionado 6/10 do volume utilizado para homogenização, de solução de acetato de potássio 8 M e em seguida, foi realizada

uma segunda incubação a 4° C durante 45 minutos. Após este procedimento, o material foi centrifugado (10 minutos, a 4° C e a 14.000 RPM) para a separação da fase aquosa, que continha o DNA, do precipitado que foi descartado. A esta fase aquosa foram adicionados 2 volumes de etanol e em seguida, centrifugada (5 minutos, temperatura ambiente e 14.000 RPM) para precipitação dos ácidos nucléicos. Esse precipitado foi lavado com solução de etanol 75 % e em seguida foi seco, ressuspendido em 30 µl de água milli-Q (Millipore) e incubado por 1 hora na presença de RNase A (Sigma), a uma concentração final de 100 µg/ml, para eliminação do RNA destas amostras.

Detecção da presença de *Wolbachia* através de PCR

A partir do DNA total extraído das moscas-de-frutas e parasitóides realizamos reações de PCR utilizando os iniciadores específicos de *Wolbachia*: *wsp* 81F (5'TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC3') e *wsp* 691R (5'AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA3') de uma porção do gene *wsp* codificador de uma proteína de membrana destas bactérias (ZHOU *et al.*, 1998). Uma linhagem de *Ceratitis capitata*, estabelecida no laboratório e infectada com *Wolbachia* (ROCHA *et al.*, 2005), foi usada como controle das reações para a detecção de *Wolbachia*. Nos casos negativos, as mesmas amostras de DNA foram testadas para amplificação de uma porção do gene eucarioto 28S rDNA utilizando os iniciadores: 28S-F (5'CCC TGT TGA GCT TGA CTC TAG TCT GGC3') e 28S-R (5'AAG AGC CGA CAT CGA AAG ATC3'). Esse procedimento foi adotado para avaliar a qualidade do DNA usado como molde para PCR de detecção das bactérias. Para as amostras em que essa amplificação também fora negativa, foram testadas novas concentrações de DNA na amplificação após diluições ou acréscimo da concentração de DNA final das reações, conforme descrito por WERREN *et al.* (1995a). Nos casos em que, após todos esses procedimentos, não foi possível fazer as amplificações, novas extrações de DNA de indivíduos daquela amostra populacional foram feitas e repetido todo o procedimento descrito acima.

As reações do PCR tiveram um volume final de 20µl sendo aproximadamente 3µl da amostra de DNA (concentração não determinada) solubilizada em água destilada e deionizada, 2,0µl de tampão 10x (Invitrogen), 1,0µl de MgCl₂ (50mM), 1,0µl de dNTPs (5mM) (Invitrogen), 0,5µl de iniciador direto (20µM), 0,5µl de iniciador reverso (20µM) e 0,25µl de Taq Polymerase (5u/µl) (Invitrogen) completado, até o volume final desejado, com água destilada e deionizada. Os ciclos de amplificação com os iniciadores *wsp* 81F e *wsp* 691R foram de 2 min 95°C, seguido de 35 ciclos (1 min a 95°C, 1 min a 55°C, 1 min a 75°C) e mais 5 min a 72°C. Para amplificar a porção do 28S rDNA eucariótico usando os iniciadores 28S-F e 28S-R usamos um ciclo (2 min 95°C), seguido de 35 ciclos (30 seg a 95°C, 1 min a 55°C, 1 min e 30 seg a 72°C) e mais 3 min a 72°C (WERREN *et al.*, 1995).

Eletroforese

Cerca de 15 % do volume dos produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese para visualização dos fragmentos e verificação do seu tamanho. As eletroforeses foram realizadas em gel de agarose 0.8 % (Gibco) em cubas horizontais e tampão de corrida TAE 1X (40 mM Tris-acetato e 1mM EDTA pH 8,0), a uma voltagem em torno de 86 V. Às amostras aplicadas no gel, foi adicionado tampão contendo 0,015 % de azul de bromofenol, 0,015 % de xilenocianol e 30 % de glicerol a uma concentração final de 20 %. Para visualização dos fragmentos de DNA, os géis foram corados com brometo de etídeo a 5 µg/ml e em seguida visualizados em um transluminador UV.

Seqüenciamento e avaliação de consensos

Os fragmentos amplificados foram diretamente seqüenciados após uma prévia purificação utilizando o “kit” de purificação de DNA de gel (Eppendorf), segundo protocolo do fabricante. Os seqüenciamentos foram feitos, utilizando o ABI Prism BigDye Terminator Cycles Sequencing Ready Reaction Kit no seqüenciador ABI 3700 (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante.

As reações de seqüenciamento foram realizadas de modo a termos pelo menos duas réplicas de extremidade de cada uma das amostras. Deste modo, após a obtenção das seqüências, realizamos um alinhamento utilizando o programa computacional SeAl para obtermos os consensos de cada uma das amostras.

Clonagem de fragmentos amplificados por PCR

Nos casos em que o seqüenciamento direto dos produtos de PCR gerou eletroferogramas com picos múltiplos para um mesmo sítio, os fragmentos amplificados foram clonados usando o Topo Cloning Kit (Invitrogen) com transformação química em bactérias Top 10 (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Dez clones foram seqüenciados para cada amostra, isolando-se as múltiplas seqüências presentes nessas amostras. Para o seqüenciamento dos clones foram usados os iniciadores fornecidos no “kit” de clonagem utilizado.

Extração de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina

As bactérias foram crescidas em 3 ml de meio de cultura LB contendo 100 µg/ml do antibiótico carbenicilina e incubadas a 37°C durante uma noite e agitadas, para aeração do meio, a uma rotação de 200 rpm. Foram transferidos 1,5 ml da cultura para um tubo de polipropileno e submetidas a centrifugação por 1 minuto a 14000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 100 µl da solução GTE (Tris 20 mM, pH 8,0, glicose 50 mM, EDTA 10 mM). A seguir, foram adicionados 200 µl de NaOH 0,2 N, SDS 1% homogeneizando-se por inversão e 150 µl de acetato de potássio 3 M pH 4,8. Após centrifugação de 6 minutos a 14000 rpm, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, completando-se para 1,5 ml com etanol 100% e misturando-se vigorosamente. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com etanol 70%, seco a 37°C e ressuspendido em 50 µl de TE contendo RNase para 20 µg/ml.

Construção de árvores filogenéticas

Além das seqüências obtidas neste trabalho, adicionamos em nosso estudo vinte e cinco seqüências obtidas no banco de dados GenBank para compararmos a relação das linhagens encontradas nas moscas-de-frutas e braconídeos parasitóides associados. Estas seqüências encontram-se listadas na Tabela II.

Primeiramente, todas as seqüências de fragmentos do gene *wsp* foram inseridas em um único arquivo (Anexo I), com o qual foi feito um alinhamento múltiplo, usando o programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994) com os parâmetros *default* do mesmo. O alinhamento resultante da etapa anterior foi editado, removendo-se as porções terminais de seqüências que não apresentavam trechos correspondentes nas demais.

O POY (WHEELER *et al.*, 2003) é um programa de análise filogenética de seqüências que implementa procedimentos heurísticos para obtenção de árvores mais parcimoniosas para um conjunto de dados, que podem ser seqüências de DNA, considerando um conjunto de parâmetros de custos de transformações. Para obtenção das árvores mais parcimoniosas o programa implementa os métodos clássicos de busca heurística e pelo método de otimização direta encontra o(s) alinhamento(s) que explique(m) as topologias das árvores encontradas com menor custo naquelas buscas (DE LAET & WHEELER, 2003). Este procedimento de otimização direta apresenta um alto custo de tempo computacional sendo o programa capaz de trabalhar mais rapidamente quando se utilizam vários alinhamentos de seqüências curtas, em lugar de poucos alinhamentos de seqüências longas. Por isso, para as análises deste trabalho, o alinhamento prévio resultante da etapa anterior foi dividido em cinco partes, adotando-se trechos conservados como critério para os pontos de partição. Assim, cada um dos cinco alinhamentos resultantes apresentariam uma região variável (filogeneticamente informativas), flanqueada por trechos conservados. Dessa maneira, garantimos que os trechos em que as seqüências eram variáveis, não fossem desmembrados. Os pontos em que esse alinhamento prévio foi dividido encontram-se indicados no

Anexo II. Em seguida, os cinco alinhamentos resultantes foram editados, todos os *gaps* inseridos no alinhamento foram removidos e analisados em POY.

As análises em POY das cinco partições acima referidas, foram repetidas para sete conjuntos de parâmetros distintos de custos de inserção de *gap*, transição e transversão. A inserção de *gaps* variou em 1, 2, 4 e 8, enquanto que a razão de custos de transversão/transição variou em 1 e 2. Para cada conjunto de parâmetros, as análises foram conduzidas com os seguintes comandos: “-nodiscrepancies”, “-replicates 50”, “-maxtrees 5”. A seqüência AF020059 depositada no GenBank da linhagem de *Wolbachia*, pertencente ao grupo B e encontrada em *Aedes albopictus* foi definida como grupo externo.

Tabela II. Número de acesso, organismo hospedeiro, linhagem, referência e grupos das seqüências de fragmentos do gene *wsp* da *Wolbachia*, depositadas no GenBank e que foram utilizadas para comparação com as seqüências das linhagens encontradas no presente trabalho.

úmero de acesso	Organismo hospedeiro	Linhagem	Referência bibliográfica	Super Grupo	Grupo (Kyei-Poku et al., 2005)
AF020059	<i>Aedes albopictus</i>	wAlbB	Zhou et al. (1998)	B	Pip
AF020067	<i>Drosophila simulans</i>	wCof	Zhou et al. (1998)	A	Mel
AF020075	<i>Ephestia cautella</i>	wCauA	Zhou et al. (1998)	A	Haw
AF020077	<i>Drosophila austeni</i>	wAus	Zhou et al. (1998)	A	Aus
AF020071	<i>Muscidifurax uniraptor</i>	wUni	Zhou et al. (1998)	A	Uni
AF020078	<i>Glossina centralis</i>	wCen	Zhou et al. (1998)	A	Mors
AF020079	<i>Glossina morsitans</i>	wMors	Zhou et al. (1998)	A	Mors
AF020070	<i>Drosophila simulans</i>	wRi	Zhou et al. (1998)	A	Ri
AF020081	<i>Nasonia vitripennis</i>	wVitA	Zhou et al. (1998)	A	Mors
AF020072	<i>Drosophila melanogaster</i>	wMel	Zhou et al. (1998)	A	Mel
AF020082	<i>Phlebotomus papatasi</i>	wPap	Zhou et al. (1998)	A	Pap
AF020058	<i>Aedes albopictus</i>	wAlbA	Zhou et al. (1998)	A	Aus
AF020073	<i>Drosophila sechellia</i>	wHa	Zhou et al. (1998)	A	Haw
AY620229	<i>Drosophila willistoni</i>	wWil	Miller & Riegler (2006)	A	-
AF418556	<i>Rhagoletis cerasi</i>	wCer1	Riegler & Staufer (2002)	A	-
AF418557	<i>Rhagoletis cerasi</i>	wCer2	Riegler & Staufer (2002)	A	-
AY157680	<i>Diachasmimorpha longicaudata</i>	-	Sintupachee et al.(2006)	A	-
AF020068	<i>Drosophila simulans</i>	wHa	Zhou et al. (1998)	A	Haw
AY330316	<i>Trinoton querquedulae</i>	wTque2	Kyei-Poku et al. (2005)	A	Tque
AY331986	<i>Echinophytirus horridus</i>	wEhor2	Kyei-Poku et al. (2005)	A	Hor
AY330323	<i>Linognathus setosus</i>	wLset4	Kyei-Poku et al. (2005)	A	Seto
AF326978	<i>Formica truncorum</i>	-	Kyei-Poku et al. (2005)	A	Trunc
AF243435	<i>Solenopsis invicta</i>	wInvA	Kyei-Poku et al. (2005)	A	InvA
AF472559	<i>Acromyrmex insinuator</i>	wInsA	Kyei-Poku et al. (2005)	A	InsA
AY596781	<i>Pediculus humanus capitis</i>	wArg1	Perotti et al. (2004)	A	-

IV. RESULTADOS

Detecção e caracterização de linhagens de *Wolbachia*

Os resultados da detecção de *Wolbachia* em amostras de *Anastrepha* e nas espécies de parasitóides associadas, feita com base na amplificação de uma porção do gene *wsp* específico destas bactérias, estão apresentados na Tabela III. A Figura 1 mostra bandas de aproximadamente 650kb obtidas nos casos em que as amostras estudadas mostravam-se positivas quanto a presença de *Wolbachia*.

Os fragmentos, amplificados pelos iniciadores *wsp* 81F e *wsp* 691R na detecção de *Wolbachia* nas amostras estudadas, foram submetidos a seqüenciamento e as seqüências obtidas foram alinhadas para a caracterização das linhagens de *Wolbachia* presentes nas amostras estudadas. Foram encontradas vinte e uma seqüências distintas (Anexo I) e cada uma foi considerada como uma linhagem distinta de *Wolbachia*. Destas vinte e uma linhagens, existem oito mais divergentes entre si (w1.0, w2.0, w3.0, w4.0, w5.0, w6.0, w7.0 e w8.0), enquanto as demais apresentam poucas substituições nas seqüências em relação àquelas (por exemplo, w3.1, w3.2 e w3.3 apresentam poucas substituições em relação a linhagem w3.0). Estas pequenas variações vão desde substituições únicas, como a que ocorre entre as linhagens w3.0 e w3.1, até variações que envolvem um maior número de substituições, como as três que ocorrem entre as linhagens w1.0 e w1.5.

A Tabela IV mostra uma matriz de identidade entre as vinte e uma seqüências obtidas, gerada a partir do alinhamento apresentado no Anexo I. Nota-se que as seqüências dentro dos conjuntos (w1.0, w1.1, w1.2, w1.3, w1.4, w1.5, w1.6, w1.7 e w1.8), (w3.0, w3.1, w3.2 e w3.3), (w4.0 e w4.1) e (w8.0 e w8.1) apresentam índices de similaridade maior ou igual a 0,990. Os valores desse índice existentes entre as seqüências destes grupos e as demais seqüências (w2.0, w5.0, w6.0 e w7.0) são mais baixos, o que significa seqüências menos semelhantes entre si. Este critério de semelhança foi considerado nas denominações dadas às linhagens encontradas neste trabalho.

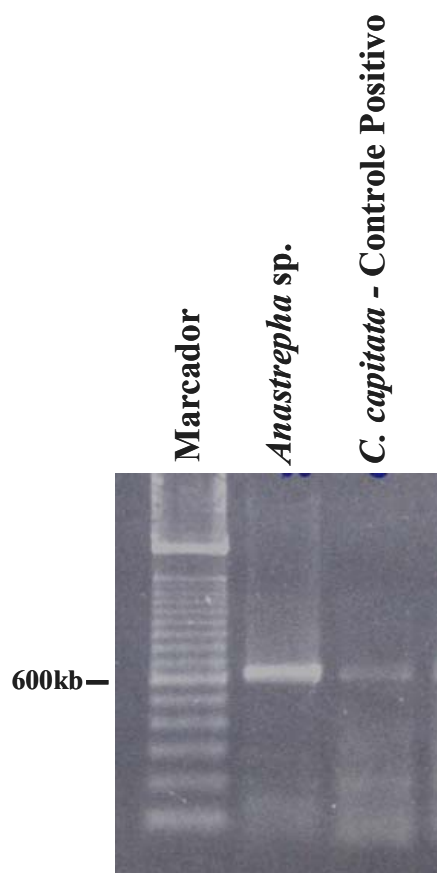


Figura 1. Foto de gel de agarose exemplificando o fragmento do gene *wsp* amplificado com o uso dos iniciadores *wsp81-F* e *wsp691-R*.

Tabela III. Linhagens de *Wolbachia* detectadas em espécies de *Anastrepha* e braconídeos nas atas coletadas. Estão assinaladas em negrito as congruências das linhagens entre pares de espécies *Anastrepha*-braconídeo.

<i>Anastrepha</i>		Braconídeos		Amostra	
Espécie	Linhagem de <i>Wolbachia</i>	Espécie	Linhagem de <i>Wolbachia</i>	Fruto	Localidade
<i>A. macrura</i>	w1.0	<i>Doryctobracon areolatus</i>	w1.3	Burra Leiteira (<i>Ficus organensis</i>)	Natal-RN
<i>A. serpentina</i>	-				
<i>A. amita</i>	w3.1 e w3.3	<i>D. areolatus</i>	w2.0	Pombeiro (<i>Citharexylum myrianthum</i>)	São Paulo-SP
		<i>D. brasiliensis</i>	w1.0, w1.4, w1.5, w1.6, w1.7, w8.0 e w8.1		
		<i>O. bellus</i>	-		
		<i>Utetes anastrephae</i>	w3.0 e w3.1		
<i>A. sp.1 aff. fraterculus</i>	w3.1	<i>D. brasiliensis</i>	w1.0	Nêspera (<i>Eriobotrya japonica</i>)	Vargem Grande Paulista-SP
<i>A. obliqua</i>	w2.0, w3.1, w4.0, w4.1, w5.0 e w6.0	<i>A. anastrephae</i>	-	Carambola (<i>Averrhoa carambola</i>)	Caçapava-SP
<i>A. sp.1 aff. fraterculus</i>	w3.1	<i>D. areolatus</i>	w2.0	Goiaba (<i>Psidium guajava</i>)	São Paulo-SP
		<i>D. brasiliensis</i>	w1.0		
		<i>Opius bellus</i>	w2.0		
		<i>U. anastrephae</i>	w3.0 e w3.1		
<i>A. sp.2 aff. fraterculus</i>	w3.1 e w3.3	<i>D. areolatus</i>	w2.0	Chapéu-de-sol (<i>Terminalia catappa</i>)	Boiçucanga-SP
		<i>O. bellus</i>	w2.0		
		<i>U. anastrephae</i>	w3.0 e w3.1		
<i>A. obliqua</i>	w3.1 , w3.2 e w7.0	<i>A. anastrephae</i>	-	Carambola (<i>Averrhoa carambola</i>)	Indaiatuba-SP
		<i>D. areolatus</i>	w1.1		
		<i>O. bellus</i>	w3.1		
		<i>U. anastrephae</i>	w3.1		
<i>A. montei</i>	w1.8	<i>D. fluminensis</i>	w1.2	Mandioca (<i>Manihot esculenta</i>)	Taubaté-SP
<i>A. pickeli</i>	w1.2				
<i>A. sp.2 aff. fraterculus</i> *	*	<i>D. areolatus</i>	w2.0	Nêspera (<i>Eriobotrya japonica</i>)	Tijucas-SC
<i>A. obliqua</i>	w3.1	<i>D. areolatus</i>	w1.1	Manga (<i>Mangifera indica</i>)	Lorena-SP
<i>A. obliqua</i>	w3.1	<i>D. areolatus</i>	w1.1	Manga (<i>Mangifera indica</i>)	Bemposta-RJ
		<i>U. anastrephae</i>	w3.0 e w3.1		
<i>A. obliqua</i>	w3.1	<i>D. areolatus</i>	w1.1	Carambola (<i>Averrhoa carambola</i>)	Brasília-DF
		<i>O. bellus</i>	w2.0		
		<i>U. anastrephae</i>	w3.0		

* Para essa amostra de *Anastrepha* não foi realizado teste quanto a detecção de *Wolbachia*

Tabela IV. Matriz de identidade entre as seqüências das linhagens de *Wolbachia* detectadas em amostras *Anastrepha* e de braconídeos associados. Em negrito estão assinalados os valores acima de 0,990.

	w1.0	w1.1	w1.2	w1.3	w1.4	w1.5	w1.6	w1.7	w1.8	w2.0	w3.0	w3.1	w3.2	w3.3	w4.0	w4.1	w5.0	w6.0	w7.0	w8.0
w1.0																				
w1.1	0,998																			
w1.2	0,996	0,994																		
w1.3	0,998	0,996	0,994																	
w1.4	0,994	0,992	0,990	0,992																
w1.5	0,994	0,992	0,990	0,992	0,989															
w1.6	0,996	0,994	0,992	0,994	0,990	0,990														
w1.7	0,996	0,994	0,992	0,994	0,990	0,998	0,992													
w1.8	0,996	0,994	0,992	0,994	0,990	0,990	0,992	0,992												
w2.0	0,792	0,791	0,794	0,791	0,794	0,787	0,792	0,789	0,791											
w3.0	0,794	0,793	0,798	0,793	0,793	0,789	0,793	0,791	0,793	0,803										
w3.1	0,796	0,794	0,800	0,794	0,794	0,791	0,794	0,793	0,794	0,805	0,998									
w3.2	0,793	0,791	0,796	0,791	0,791	0,788	0,791	0,789	0,791	0,802	0,994	0,996								
w3.3	0,794	0,793	0,798	0,793	0,793	0,789	0,793	0,791	0,793	0,803	0,996	0,998	0,994							
w4.0	0,794	0,792	0,795	0,792	0,795	0,788	0,794	0,790	0,792	0,889	0,905	0,907	0,903	0,905						
w4.1	0,790	0,788	0,792	0,788	0,792	0,785	0,790	0,786	0,788	0,887	0,903	0,905	0,902	0,903	0,994					
w5.0	0,790	0,788	0,793	0,788	0,788	0,785	0,788	0,786	0,788	0,847	0,953	0,954	0,951	0,953	0,864	0,862				
w6.0	0,799	0,797	0,801	0,797	0,801	0,794	0,799	0,795	0,797	0,950	0,847	0,848	0,845	0,847	0,936	0,934	0,807			
w7.0	0,806	0,804	0,808	0,804	0,808	0,801	0,806	0,802	0,804	0,873	0,920	0,922	0,919	0,920	0,980	0,978	0,879	0,920		
w8.0	0,902	0,900	0,899	0,900	0,900	0,897	0,899	0,899	0,900	0,796	0,846	0,847	0,844	0,846	0,846	0,843	0,828	0,813	0,859	
w8.1	0,900	0,899	0,897	0,899	0,899	0,895	0,897	0,897	0,899	0,794	0,844	0,846	0,842	0,844	0,845	0,841	0,827	0,811	0,857	0,998

Estas linhagens, pouco divergentes entre si, encontraram-se distribuídas tanto conjuntamente numa mesma amostra, quanto isoladamente. Além disto, as mesmas também ocorrem na presença de linhagens mais divergentes.

Linhagens de *Wolbachia* encontradas nas espécies de *Anastrepha*

Dentre as amostras de *Anastrepha* analisadas (Tabela III), oito delas apresentaram infecção simples, ou seja, apenas uma linhagem de *Wolbachia* foi encontrada, enquanto que duas das cinco amostras de *A. obliqua*, coletadas em Indaiatuba e Caçapava apresentaram infecção múltipla. Na amostra de *A. serpentina* a bactéria não foi encontrada. Sendo assim, o grau de infecção entre as espécies das moscas-das-frutas analisadas foi de 88,9%, e entre as amostras foi de 93,3%.

A linhagem w3.1 foi a única encontrada nas duas amostras de *A. sp1. aff. fraterculus* e nas amostras de Brasília, Bemposta e Lorena de *A. obliqua*. Ainda nesta última espécie, w3.1 ocorreu em conjunto com outras linhagens de *Wolbachia* nas amostras de Caçapava e Indaiatuba. Além de w3.1, estavam presentes as linhagens w2.0, w4.0, w4.1, w5.0 e w6.0 na amostra de Caçapava e de w3.2 e w7.0 na amostra de Indaiatuba. Em *A. macrura*, *A. montei* e *A. pickeli* ocorreram as linhagens w1.0, w1.8 e w1.2, respectivamente. Além dos casos já mencionados, a múltipla infecção ocorreu nas amostras de *A. amita* e *A. sp2 aff. fraterculus* em que estiveram presentes as linhagens w3.1 e w3.3.

Linhagens de *Wolbachia* encontradas nas espécies de braconídeos

Do total de vinte e seis amostras estudadas, as duas da espécie *Asobara anastrephae* e uma de *Opius bellus*, não apresentaram infecção, enquanto as demais encontraram-se infectadas (Tabela III). Dessas vinte e três amostras infectadas por *Wolbachia*, apenas cinco apresentaram infecção múltipla, sendo elas: *D. brasiliensis* associada a *A. amita* e quatro populações de *U. anastrephae* coletadas em Bemposta, Boiçucanga e duas populações de São Paulo encontradas

parasitando *A. amita* e *A. sp.1 aff. fraterculus*. Do total de amostras de parasitóides estudadas, 88,4% apresentam os endossimbiontes e 83,3% das espécies de braconídeos estudadas nesta amostragem estavam infectadas.

Dentre os braconídeos estudados nas sete amostras da espécie *U. anastrephae* foi verificada a presença de duas linhagens de *Wolbachia* (w3.0 e w3.1). Essas linhagens ocorreram conjuntamente nas duas amostras de São Paulo, na de Bemposta e Boiçucanga. Enquanto w3.0 e w3.1 ocorreram isoladamente nas amostras de Brasília e Indaiatuba, respectivamente.

O. bellus, que neste trabalho está representado por quatro diferentes amostras, exibiu duas diferentes linhagens: w2.0 presente nas amostras de Boiçucanga, Brasília e São Paulo e w3.1, presente na amostra coletada em Indaiatuba.

As duas amostras de *D. brasiliensis*, coletadas em São Paulo e Vargem Grande Paulista hospedavam a linhagem w1.0. *D. fluminensis* coletado em Taubaté, estava infectado com a linhagem w1.2.

Em *D. areolatus*, espécie mais frequentemente amostrada, encontramos a linhagem w2.0 presente isoladamente em duas amostras de São Paulo e nas de Tijuca e Boiçucanga. Numa terceira amostra de São Paulo, encontramos a linhagem w1.1 e esta foi ainda encontrada em *D. areolatus* nas localidades de Bemposta, Brasília, Indaiatuba e Lorena. Numa outra amostra de São Paulo, em que esta espécie de parasitóide foi coletada em associação com *Anastrepha amita*, foram encontradas sete linhagens diferentes das que foram observadas nas outras amostras de *D. areolatus* (w1.0, w1.4, w1.5, w1.6, w1.7, w8.0 e 8.1).

Congruência das linhagens de *Wolbachia* entre espécies de *Anastrepha* e braconídeos associados

Na Tabela III estão destacadas as linhagens de *Wolbachia* que ocorrem nas espécies de braconídeos e nas respectivas moscas-das-frutas hospedeiras. As linhagens w1.2 e w3.1 ocorrem em uma mesma amostra em pares de espécies parasitóide-hospedeiro. A primeira, ocorreu na amostra coletada em frutos de mandioca no município de Taubaté – SP em *Doryctobracon fluminensis* e em

Anastrepha pickeli, enquanto a segunda ocorreu no braconídeo *Utetes anastrephae* associado a *A. amita*, *A. sp2 aff. fraterculus*, *A. sp.1 aff. fraterculus* e duas amostras de *A. obliqua*. Além destes, ocorreu também em *Opius bellus* na amostra coletada em carambola no município de Indaiatuba – SP, enquanto parasitava *A. obliqua*.

A Tabela V resume estas observações e mostra o número de congruências de uma determinada linhagem de *Wolbachia* em pares de espécies braconídeos-*Anastrepha*. Para as espécies *D. areolatus* e *D. brasiliensis*, não houve congruência entre as suas linhagens de *Wolbachia* com as encontradas nas espécies de *Anastrepha*. Diferentemente, para as espécies *O. bellus* e *D. fluminensis*, ocorreu apenas uma congruência da linhagem de *Wolbachia*, de cada uma delas, com uma das espécies de moscas-das-frutas. No entanto, para *U. anastrephae*, que foi obtida a partir de seis amostras de *Anastrepha* (quatro espécies), em cinco das amostras houve coincidência da linhagem w3.1.

Comparação das seqüências obtidas com outras depositadas em banco de dados

As seqüências obtidas nesse trabalho foram comparadas com outras depositadas no banco de dados GenBank e mostraram uma alta similaridade com o gene *wsp* da bactéria *Wolbachia*. A Tabela VI mostra que para as oito linhagens detectadas neste trabalho, algumas seqüências guardam alta similaridade com outras seqüências depositadas no GenBank, indicando que todas pertencem ao grupo A da *Wolbachia*. A Tabela VI mostra ainda, os hospedeiros e as localidades em que essas bactérias foram encontradas. Podemos observar a grande variação entre as localidades em que essas linhagens são encontradas, havendo uma distribuição inclusive em outros continentes.

Análises filogenéticas

Seguindo o método descrito anteriormente, obtivemos um grande número de árvores igualmente parcimoniosas para cada um dos conjuntos de parâmetros de

Tabela V. Número de congruências entre as linhagens de *Wolbachia* encontradas nos parasitóides e nas amostras de *Anastrephas* hospedeiras

Espécies de parasitóides	Número de espécies de <i>Anastrepha</i> associadas	Número total de associações braconídeo-<i>Anastrepha</i> (Nt)	Número de congruências de linhagens de <i>Wolbachia</i> (Nc)	Índice de congruência (Nc/Nt)
<i>D. areolatus</i>	6	8	0	0,00
<i>D. brasiliensis</i>	2	3	0	0,00
<i>O. bellus</i>	4	5	1	0,20
<i>D. fluminensis</i>	2	3	1	0,25
<i>U. anastrephae</i>	4	6	5*	0,83

* Somente na amostra de Brasília não houve coincidência da linhagem w3.1 em *U. anastrephae* e *Anastrepha* hospedeira.

Tabela VI. Sequências depositadas no banco de dados GenBank que guardam similaridade com as seqüências de *Wolbachia* encontradas nas diferentes amostras dos organismos utilizadas no presente trabalho.

Linha gem	Número de acesso (GenBank)	Hospedeiro	Localidade
w 1 . 0	AF521161	<i>Pegoscapus longiceps</i> (Hymenoptera)	Panamá
	AF521160	<i>Idarnes sp.</i> (Hymenoptera)	Panamá
	AF521151	<i>Pegoscapus herrei</i> (Hymenoptera)	Panamá
	AF521164	<i>Pegoscapus hoffmeyeri</i> (Hymenoptera)	Panamá
	AF521163	<i>Pegoscapus insularis</i> (Hymenoptera)	Panamá
	AF124859	<i>Asobara tabida</i> (Hymenoptera)	Antilhas
w 2 . 0	AB024571	<i>Ephestia cautella</i> (Lepidoptera)	Japão
	AY095150	<i>Andricus solitarius</i> (Hymenoptera)	França
	AY095149	<i>Synergus umbraculus</i> (Hymenoptera)	França
	AY095148	<i>Synergus diaphanus</i> (Hymenoptera)	Hungria
	AY095147	<i>Synergus reinhardti</i> (Hymenoptera)	Hungria
	AF020068	<i>Drosophila simulans</i> (Diptera)	Havaí
	AY330311	<i>Pectinopygus tortoffi</i> (Pthiraptera)	Canadá
	AB094391	<i>Mycalesis francisca</i> (Lepidoptera)	Japão
	AY331125	<i>Pthirus pubis</i> (Pthiraptera)	Itália
w 3 . 0	AY620209	<i>Drosophila septentriosaltans</i> (Diptera)	Panamá
	AY878111	<i>Pseudacteon obtusus</i> (Diptera)	Argentina
	AY291348	<i>Drosophila yakuba</i> (Diptera)	Camarões
	AY291347	<i>Drosophila yakuba</i> (Diptera)	Gabão
	AF418557	<i>Rhagoletis cerasi</i> (Diptera)	Áustria
	AY620229	<i>Drosophila willistoni</i> (Diptera)	Brasil

	AY620224	<i>Drosophila willistoni</i> (Diptera)	Uruguai
	AY620223	<i>Drosophila willistoni</i> (Diptera)	Equador
	AY620218	<i>Drosophila willistoni</i> (Diptera)	México
w 4 . 0	AY095156	<i>Callyrhytis glandium</i> (Hymenoptera)	Hungria
	AF418556	<i>Rhagoletis cerasi</i> (Diptera)	Áustria
	DQ093845	<i>Aedes polynesiensis</i> (Diptera)	Polinésia
	DQ093842	<i>Aedes polynesiensis</i> (Diptera)	Polinésia
	AY291348	<i>Drosophila yakuba</i> (Diptera)	Camarões
	AY291347	<i>Drosophila teissieri</i> (Diptera)	Gabão
	AY291346	<i>Drosophila yakuba</i> (Diptera)	Gabão
	AF481196	<i>Temelucha philippinensis</i> (Hymenoptera)	Tailândia
	AF481189	<i>Macrocentrus philippinensis</i> (Hymenoptera)	Tailândia
w 5 . 0	AY567683	<i>Pleistodontes imperialis</i> (Hymenoptera)	Austrália
	AY291348	<i>Drosophila yakuba</i> (Diptera)	Camarões
	AY291347	<i>Drosophila teissieri</i> (Diptera)	Gabão
	AY291346	<i>Drosophila yakuba</i> (Diptera)	Gabão
	AY878111	<i>Pseudacteon obtusus</i> (Diptera)	Argentina
	AF418557	<i>Rhagoletis cerasi</i> (Diptera)	Austria
w 6 . 0	AB024571	<i>Ephestia cautella</i> (Lepidoptera)	Japão
	AY095150	<i>Andricus solitarius</i> (Hymenoptera)	França
	AY095148	<i>Synergus diaphanous</i> (Hymenoptera)	Hungria
	AB094391	<i>Mycalesis francisca</i> (Lepidoptera)	Japão
	AF020068	<i>Drosophila simulans</i> (Diptera)	Havai
	AY330311	<i>Pectinopygus tortoffi</i> (Phthiraptera)	Canadá

	AY331125	<i>Pthirus pubis</i> (<i>Phthiraptera</i>)	Itália
	AY331112	<i>Pediculus humanus</i> <i>humanus</i> (<i>Phthiraptera</i>)	Canadá
	AY330314	<i>Quadriceps sp.</i> (<i>Phthiraptera</i>)	Canadá
	AY331122	<i>Echinophthirius horridus</i> (<i>Phthiraptera</i>)	Noruega
	AY095151	<i>Andricus solitarius</i> (<i>Hymenoptera</i>)	França
w 7 .0	AY138260	<i>Diabrotica virgifera</i> (<i>Coleoptera</i>)	EUA
	AY095156	<i>Callyrhytis glandium</i> (<i>Hymenoptera</i>)	Hungria
	AF418556	<i>Rhagoletis cerasi</i> (<i>Diptera</i>)	Áustria
	DQ093845	<i>Aedes polynesiensis</i> (<i>Diptera</i>)	Polinésia
	AY291348	<i>Drosophila yakuba</i> (<i>Diptera</i>)	Camarões
	AY291347	<i>Drosophila teissieri</i> (<i>Diptera</i>)	Gabão
	AY291346	<i>Drosophila yakuba</i> (<i>Diptera</i>)	Gabão
w 8 .0	AY878108	<i>Pseudacteon curvatus</i> (<i>Diptera</i>)	Argentina
	AJ585383	<i>Byturus ochraceus</i> (<i>Coleoptera</i>)	República Tcheca
	AF452644	<i>Trichogramma cacoeciae</i> (<i>Hymenoptera</i>)	Gabão
	AF481162	<i>Diopsis apicalis</i> (<i>Diptera</i>)	Gabão
	AY177734	<i>Trichogramma evanescens</i> (<i>Hymenoptera</i>)	Argentina
	AY858801	<i>Drosophila ananassae</i> (<i>Diptera</i>)	República Tcheca
	AF289670	<i>Spalangia nigroaenae</i> (<i>Hymenoptera</i>)	Camarões
	AF452645	<i>Trichogramma brassicae</i> (<i>Hymenoptera</i>)	Alemanha
	AY177734	<i>Trichogramma evanescens</i> (<i>Hymenoptera</i>)	China
	AF020070	<i>Drosophila simulans</i> (<i>Diptera</i>)	EUA
	AF289670	<i>Spalangia nigroaenae</i> (<i>Hymenoptera</i>)	Rússia

custo de substituição do tipo transição, transversão e de inserção de *gaps*. A Tabela VII mostra, para cada um destes conjuntos de parâmetros, o custo das árvores mais parcimoniosas, o número de árvores encontradas e o número de réplicas, de um total de 50, em que as árvores de menor custo foram encontradas.

O número de árvores igualmente parcimoniosas obtidas nas análises foi bastante variável, sendo que para o conjunto de parâmetros 4:2:1 foram encontradas o maior número de árvores (4852) e para o conjunto de parâmetros 8:1:1, apenas seis árvores mais parcimoniosas foram encontradas (Tabela VII). Não houve uma relação crescente entre que o número de árvores igualmente parcimoniosas em relação ao número de réplicas em que foram atingidas as árvores de menor custo para cada um dos conjuntos de parâmetros estudados. Para o conjunto de parâmetros 2:1:1, em que somente 18 réplicas atingiram árvores de menor custo, foram encontradas 1779 árvores igualmente parcimoniosas, enquanto para o conjunto de parâmetros 8:1:1, 38 réplicas atingiram às árvores de menor custo e somente 6 árvores foram encontradas (Tabela VII).

Para a análise das árvores obtidas, trabalhamos com as árvores de consenso estrito geradas a partir do grande número de árvores igualmente parcimoniosas para os conjuntos de árvores obtidas para cada conjunto de parâmetros estudados. Com a aplicação deste método de consenso, introduzido por SOKAL & ROHLF (1981), apenas grupos que se repetem em todas as árvores são mantidos. Essas topologias de árvores consenso estrito geradas são apresentadas na Figura 2. Três topologias são apresentadas para aqueles sete conjuntos de árvores igualmente parcimoniosas geradas para cada conjunto de parâmetros, sendo uma delas recorrente para cinco conjuntos de parâmetros (2:1:1, 2:2:1, 4:1:1, 4:2:1, 8:2:1) e portanto a topologia com melhor suporte (Figura 2A).

Alguns grupos de linhagens mantiveram-se presentes em todas as topologias de consenso. É o caso de (AF020068 AF020073), com ambas as linhagens previamente descritas como wHa e encontradas em *Drosophila simulans* e *D. sechellia*, o grupo ((AF020081 AF020079) AF020078) que compreende linhagens obtidas em estudos prévios com *Nasonia vitripennis*, *Glossina centralis* e *G. morsitans* e (AF020070 AY157680 AY596781) com as linhagens presentes em *D.*

simulans, no braconídeo *Diachasmimorpha longicaudata* e em *Pediculus humanus capitis* (Figura 2 e Tabela II).

As linhagens detectadas neste trabalho também formaram grupos monofiléticos que mantiveram-se em todas as árvores de consenso estrito obtidas para cada parâmetro analisado como pode ser notado nos seguintes grupamentos: ((w4.0 w4.1) w7.0), que contém as linhagens presentes em duas amostras de *A. obliqua* coletadas nos municípios de Caçapava-SP e Indaiatuba-SP; (w8.0 w8.1), que inclui duas das sete linhagens detectadas na amostra de *D. brasiliensis* que infestava pupários de *A. amita*; ((w1.5 w1.7) w1.0 w1.1 w1.2 w1.3 w1.4 w1.6 w1.8 AF326978) com as linhagens presentes em amostras de três espécies de braconídeos, três de *Anastrepha*, além da linhagem detectada no himenóptero *Formica truncorum* e o grupo (w2.0 AF020075 AF418556 (AF020073 AF020068)), no qual está presente a linhagem encontrada em uma amostra de *A. obliqua* (Caçapava-SP) e em várias amostras de *D. areolatus* e *O. bellus*, além de outras encontradas nos dípteros *D. simulans*, *D. sechellia* e *R. cerasi*, no lepidóptero *E. cautella* e na espécie de piolho *T. quercuedulae* (Figura 2 e Tabela II).

O grupo (w3.0 w3.1 w3.2 w3.3 w5.0 AF020072 AF418557 (AF020067 AY620229)), que inclui as linhagens detectadas em amostras moscas-das-frutas e de seus parasitóides estudados, linhagens presentes nas espécies *D. willistoni*, *D. simulans*, *D. melanogaster* e na mosca-das-frutas *R. cerasi*, foi obtido para todos os conjuntos de parâmetros, exceto para 8:1:1 (Figura 2C), no qual a linhagem w5.0, presente na amostra de *A. obliqua* coletada em Caçapava-SP, não está contida. Percebe-se que essa linhagem guarda similaridade com linhagens obtidas em *Ephestia cautella*, na mosca-de-fruta *Rhagoletis cerasi* e com linhagens presentes em duas espécies do gênero *Drosophila*.

A linhagem w6.0 teve seu posicionamento, variando de acordo com os parâmetros de custos adotado para busca das árvores filogenéticas (Figura 2). Essa linhagem encontra-se mais associada à linhagem w2.0, em detrimento das outras linhagens detectadas neste estudo. Outra linhagem que apresentou posicionamento variável, de acordo com os parâmetros analisados, foi w5.0. Para os parâmetros 8:1:1 esta esteve mais relacionada a linhagem w2.0 e w6.0, enquanto que para os

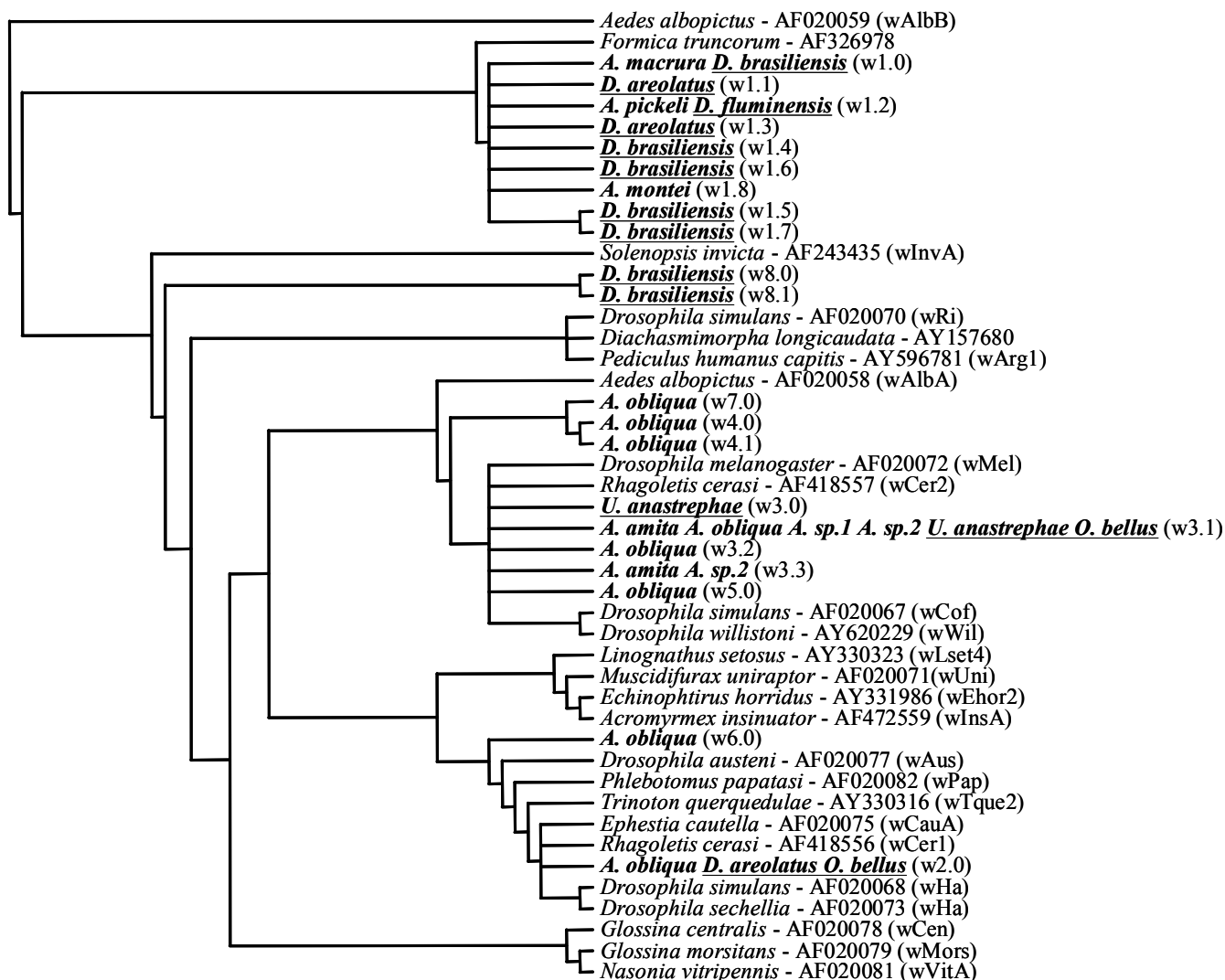
demais parâmetros, esta encontrou-se mais aparentadas as linhagens w3.0, w3.1, w3.2 e w3.3 (Figura 2).

Tabela VII. Custo das árvores mais parcimoniosas, número de árvores igualmente parcimoniosas e número de réplicas em que as árvores de menor custo foram obtidas para cada um dos conjuntos de parâmetros analisados.

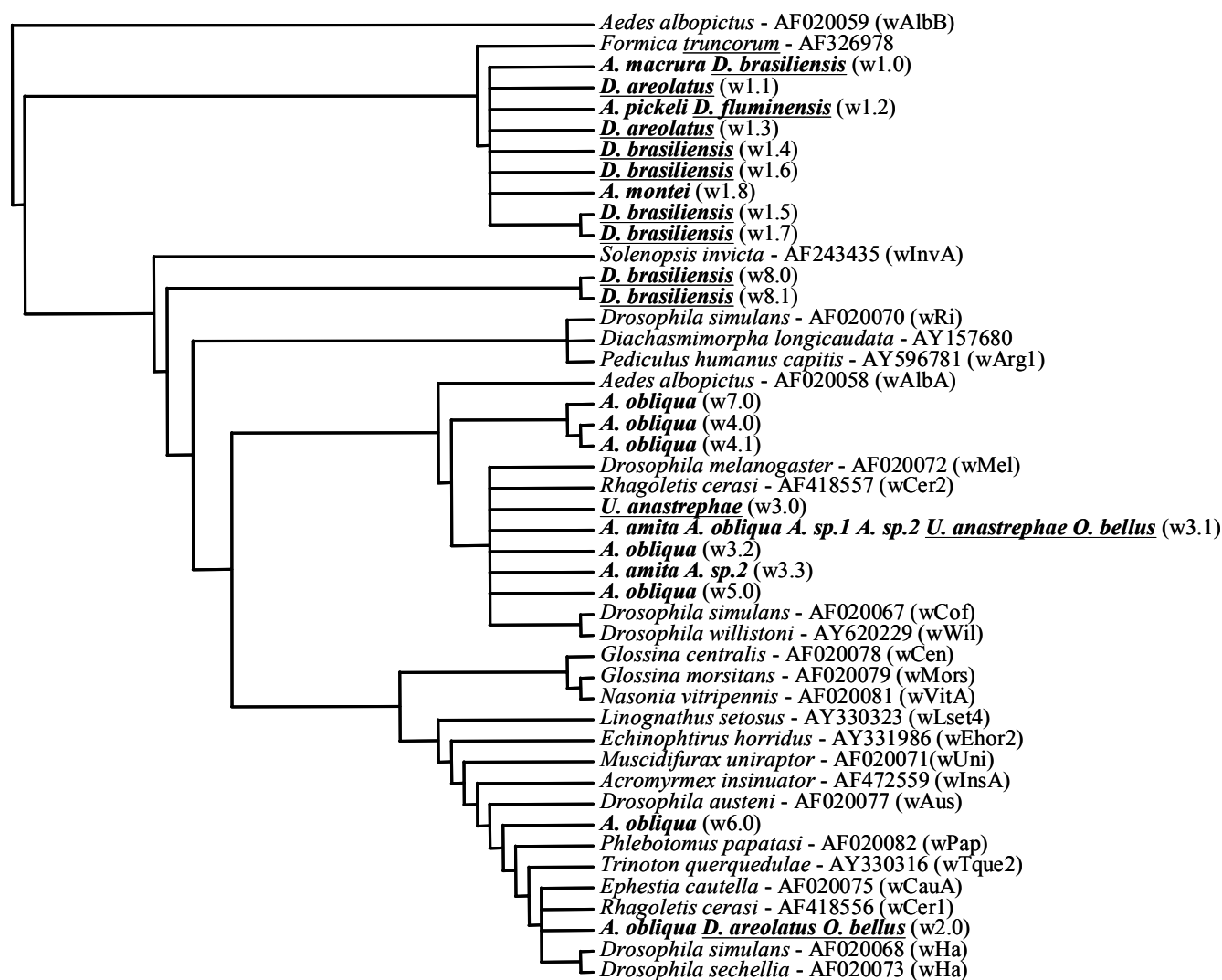
Parâmetros (<i>Gap</i>:<i>Ts</i>:<i>Tv</i>)	Custo das árvores mais parcimoniosas	Número de réplicas com árvores de menor custo (n° total = 50 réplicas)	Número de árvores igualmente parcimoniosas
1:1:1	573	36	1454
2:1:1	643	18	1779
2:2:1	809	19	1460
4:1:1	748	31	1745
4:2:1	924	41	1793
8:1:1	936	38	6
8:2:1	1128	27	59

Figura 2. Árvores de consenso estrito para cada um dos parâmetros de custo adotados: A. 1:1:1; B. 2:1:1, 2:2:1, 4:1:1, 4:2:1, 8:2:1; C. 8:1:1. Estão apresentados como táxons as espécies hospedeiras das diferentes linhagens de *Wolbachia*. Entre parênteses estão indicadas as linhagens de *Wolbachia* detectadas. As espécies e *Anastrepha* estudadas neste trabalho estão destacadas em negrito e os braconídeos em negrito e sublinhado.

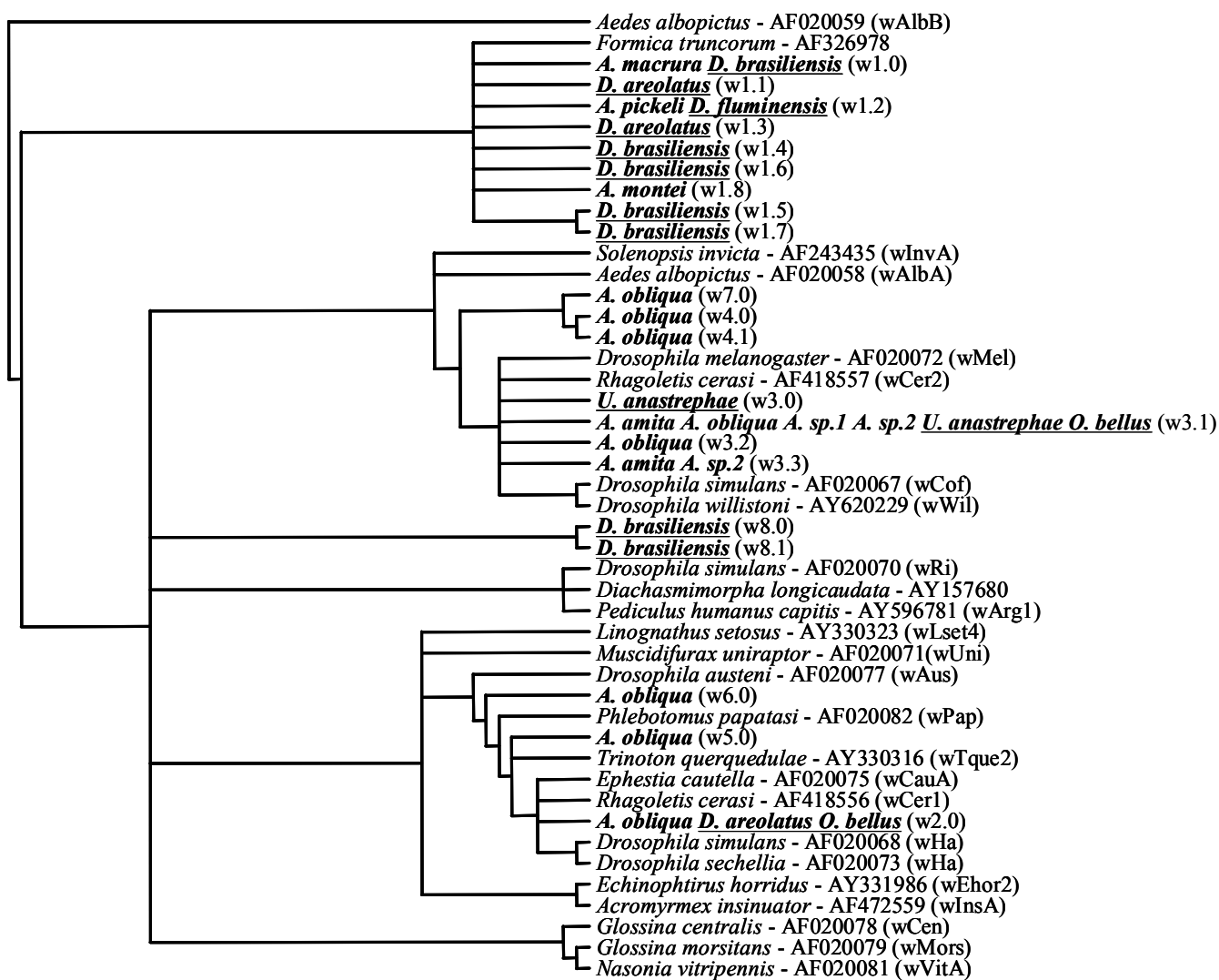
A.



B.



C.



V. DISCUSSÃO

Das espécies de braconídeos estudadas nesse trabalho, *Doryctobracon areolatus* foi a espécie com um maior número de amostras (nove) analisadas. Esta espécie é a que possui mais ampla distribuição geográfica, tendo sido registrada do México a Argentina (WHARTON *et al.*, 1981; OVRUSKI *et al.*, 2000). No Brasil, esta espécie também é amplamente distribuída, ocorrendo de forma predominante em vários Estados (CANAL & ZUCCHI, 2000). Com exceção de *D. fluminensis*, as demais espécies analisadas já haviam sido coletadas anteriormente nas áreas que foram amostradas. *D. fluminensis* que após sua descrição com material coletado em Guaratiba - DF em 1934 (COSTA LIMA, 1938) foi encontrada no município de Rochedo - MS em 1993 em larvas coletadas em frutos de mandioca (UCHÔA-FERNANDES *et al.*, 2003). Neste trabalho, essa espécie de braconídeo também foi coletada em frutos de *Manihot esculenta* de uma amostra em que emergiram indivíduos de *Anastrepha montei* e *A. pickeli*. UCHÔA-FERNANDES *et al.* (2003) sugerem que os indivíduos coletados provavelmente parasitavam larvas de *A. montei*, já que emergiram daquela amostra 71 indivíduos desta amostra em detrimento de 1 de *A. pickeli*. Em nossa amostragem, emergiu um número aproximadamente igual de indivíduos destas duas espécies.

Este trabalho mostrou que cerca de 93% das espécies de *Anastrepha* infectadas pela *Wolbachia*, sendo que para os parasitóides, essa porcentagem foi de aproximadamente 83%. Em cada um desses grupos de insetos, apenas uma espécie não estava infectada, *Anastrepha serpentina* e *Asobara anastrephae*. Considerando o total das 14 espécies estudadas, temos uma porcentagem de infecção de aproximadamente 86%. Se compararmos esses resultados com os obtidos previamente por outros autores, observamos um dos maiores valores já encontrados para um grupo animal específico. Sendo, em média, quatro vezes superior aos obtidos para diversos grupos de organismos por WERREN *et al.* (1995b), WEST *et al.* (1998) e WERREN & WINDSOR (2000), respectivamente. É ainda superior aos maiores valores já encontrados para outros grupos, como os 40% em ácaros (Acari)

(BREEUWER & JACOBS, 1996), 50% em formigas (Hymenoptera) (WENSELEERS *et al.*, 1998), 59% em vespas (Hymenoptera) (SHOEMAKER *et al.*, 2002) e 70% em moscas parasitóides do gênero *Pseudacton* (Diptera) (DEDEINE *et al.*, 2005). Os trabalhos anteriores mostram, em um número variado de organismos, que há uma grande variação no percentual de infecção para os diferentes táxons. WERREN *et al.* (1995b) encontraram, dentre as oito ordens analisadas, que em Diptera e Hymenoptera, havia maior percentual de espécies infectadas, sendo 35,7 e 26,1%, respectivamente. WERREN & WINDSOR (2000) encontraram para ordem Hymenoptera um maior grau de infecção, 31,1% que para as demais ordens. Nesse mesmo estudo, 15,4% dos dípteros estudados apresentaram-se infectados, sendo uma das espécies pertencente à família Tephritidae. Já no trabalho realizado por KITTAYAPONG *et al.* (2003), Homoptera, Lepidoptera, Hymenoptera e Diptera foram as quatro ordens em que havia um maior grau de infecção por *Wolbachia*. Portanto, parece existir uma maior tendência de alguns grupos taxonômicos em adquirirem e manterem estas bactérias, estando Diptera e Hymenoptera entre as ordens que apresentam essa tendência de modo mais acentuada. Ao mesmo tempo, existem grupos de organismos que, apesar do grande esforço amostral, não foi possível a detecção destas bactérias (BOUCHON *et al.*, 1998).

Em nosso estudo, a frequência de infecção por *Wolbachia* foi alta e semelhante em *Anastrepha* (Diptera) e Braconidae (Hymenoptera). No entanto, em uma análise anterior realizada com diferentes amostras de espécies de *Anastrepha*, observou-se infecção em todas as amostras estudadas (COSCRATO, 2006). No presente trabalho, a amostra de *A. serpentina* coletada em Natal, RN não estava infectada. No entanto, em outro estudo foi detectada a presença de *Wolbachia* nesta espécie em amostra coletada em São Sebastião – SP (COSCRATO, 2006). Todas as linhagens de bactéria encontradas nas amostras de *Anastrepha* e braconídeos pertencem ao agrupamento A de *Wolbachia*. Resultados semelhantes foram obtidos em formigas (Hymenoptera) indo-australianas, em que todas as 25 espécies infectadas apresentaram bactérias do grupo A, estando presente uma linhagem do grupo B apenas em uma espécie que apresentava múltipla infecção (WENSELEERS *et al.*, 1998). Em todas as amostras de 17 espécies de *Anastrepha* estudadas por

COSCRATO (2006), foram encontradas *Wolbachia* do grupo A, sendo que em nove delas foram encontradas associação com linhagens do grupo B. WERREN & WINDSOR (2000) sugeriram que podem existir diferenças na capacidade de bactérias do tipo A e B em infectar diferentes grupos de hospedeiros. Esses autores indicam, por exemplo, que Hymenoptera parece ter maior propensão a adquirirem *Wolbachia* pertencente ao grupo A, enquanto em Lepidoptera, bactérias do tipo B têm sido observadas em amostras da Tailândia (KITAYAPONG *et al.*, 2003). Outra possibilidade seria haver uma maior prevalência de um desses grupos de *Wolbachia* em algumas regiões em detrimento de outras.

Em conformidade com trabalhos prévios, encontramos em nossos resultados que linhagens de *Wolbachia* mais aparentadas entre si ocorrem em hospedeiros divergentes, em detrimento de coexistirem em espécies mais aparentadas. Além disso, existem linhagens que coincidiram num mesmo par de espécies braconídeo-*Anastrepha* coletados conjuntamente numa mesma amostra de fruto, o que poderia ser indicativo de eventos de transferência horizontal. No entanto, encontramos linhagens que não ocorreram em uma mesma amostragem de frutos, mas que estavam presentes, tanto em espécies de Braconídeos como de *Anastrepha*. Considerando que estas espécies de braconídeos parasitóides de *Anastrepha* são generalistas (CANAL & ZUCCHI, 2000), ou seja, que uma espécie destes braconídeos pode ser encontrada em associação com várias espécies hospedeiras, pode ter ocorrido o contágio destas bactérias via *Anastrepha*-braconídeo, em uma associação anterior a estas e que não foi flagrada em nossas amostragens.

Foi observado que quando duas espécies de *Bactrocera* infectadas emergiam de um mesma amostra de frutos, ambas possuíam uma mesma linhagem de *Wolbachia* (KITAYAPONG *et al.*, 2000b). Em nosso trabalho, o mesmo não foi observado, nas duas amostras em que emergiram mais de uma espécie de *Anastrepha*. Na amostra de frutos de *Ficus organensis*, emergiram *A. macrura* e *A. serpentina*, estando a primeira infectada com a linhagem w1.0 e a segunda livre de infecção. Já da amostra de frutos de *Manihot esculenta*, emergiram *A. montei* e *A. pickeli*, as quais estavam infectadas com as linhagens w1.8 e w1.2, respectivamente, que são linhagens muito semelhantes divergindo entre si em apenas três

nucleotídeos, nas posições 192, 470 e 524 (Anexo I) nas seqüências de *wsp*. Estas duas espécies de *Anastrepha* são especializadas em utilizar frutos de euforbiáceas e isto pode ter facilitado à presença de linhagens tão semelhantes de *Wolbachia* nestas duas espécies de hospedeiro.

Sabe-se que *A. obliqua* e as espécies do complexo *A. fraterculus* são espécies generalistas (ZUCCHI, 2000), podendo ser encontradas ocorrendo em uma mesma amostra de frutos. Nessas situações, poderia haver trocas de linhagens entre estas espécies e isso poderia explicar, por exemplo, a presença da linhagem w3.1 em todas as amostras que foram analisadas destas espécies. Estes resultados estão de acordo com os obtidos em espécies do gênero *Bactrocera* (KITAYAPONG *et al.*, 2000b), organismos aparentados e com hábitos de vida semelhantes a *Anastrepha*.

No presente trabalho, adotamos uma outra abordagem de busca de árvores, usando o método de otimização direta que possui a vantagem de considerar todos os alinhamentos possíveis para as árvores mais parcimoniosas para um conjunto de dados (por exemplo, seqüências de DNA) sem a necessidade de um pré-alinhamento (GIRIBET, 2001). Isso difere, portanto, de uma análise feita a partir de um alinhamento realizado em ClustalW em que por mais que existam mais de um alinhamento possível, apenas um é apresentado. Desta forma, acreditamos não ser necessário excluir aquela região hipervariável, na metodologia aqui empregada e, desta maneira, foi possível garantir em nossas análises a presença de um maior número de sítios filogeneticamente informativos. Os alinhamentos realizados ou “ajustados” manualmente podem ser questionados por vários motivos, dentre eles subjetividades do autor, a não possibilidade de replicabilidade do mesmo por diferentes autores e as poucas possibilidades de alinhamentos igualmente possíveis serem contemplados (PHILLIPS *et al.*, 2000; WHEELER, 2003).

Com base nos grupos monofiléticos formados entre as linhagens de *Wolbachia* detectadas neste trabalho, as linhagens já descritas por outros autores e na classificação realizada por KYEI-POKU *et al.* (2005), propomos aqui uma classificação das primeiras, nos diferentes agrupamentos já existentes. Deste modo, as linhagens w1.0, w1.1, w1.2, w1.3, w1.4, w1.5, w1.6, w1.7 e w1.8 pertencem ao grupo-*Trunc* juntamente com as *Wolbachia* de *Formica truncorum*. As linhagens

w3.0, w3.1, w3.2 e w3.3 participam do grupo-*Mel* que incluem as linhagens de *D. melanogaster* (wMel) e *D. simulans* (wCof). w2.0 do grupo-*Haw* em conjunto com *D. simulans* (wHa), *D. sechelia* (wHa) e *E. cautella* (wCauA). Quanto às demais linhagens detectadas não é possível fazer tais afirmações, já que não houve um consenso no seu posicionamento em relação às linhagens descritas devido a variações de acordo com o conjunto de parâmetros adotado nas buscas das árvores mais parcimoniosas.

A linhagem w2.0 foi encontrada em amostras de *D. areolatus* e de *O. bellus*, no entanto, esta não foi detectada em nenhuma outra das três espécies pertencentes ao gênero *Doryctobracon*. Portanto, nota-se que as linhagens não estão distribuídas de acordo com as relações filogenéticas dos hospedeiros. Em decorrência da relação parasitóide-hospedeiro sabe-se que o sucesso do primeiro é incompatível com o do segundo. Assim, a hipótese de transferência horizontal entre estas espécies parece ser mais plausível, com a aquisição das bactérias pelo parasitóide via trato digestivo. No entanto, o sentido inverso também seria possível havendo uma resposta imunológica dos hospedeiros aos ovos infectados ovipositados em sua cavidade celomática (WEST *et al.*, 1998; COURDAUX *et al.*, 2001).

Uma das linhagens previamente descritas que foi adicionada às nossas análises foi a obtida em *Diachasmimorpha longicaudata* que é uma espécie pertencente à família Braconidae (Hymenoptera). No entanto, esta linhagem encontra-se mais relacionada à linhagens encontradas em insetos pertencentes a outras ordens, *Drosophila melanogaster* (Diptera) e *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera), que aos outros braconídeos aqui estudados. Incluímos em nossas análises para fazermos a mesma comparação, linhagens presentes em *Rhagoletis*, um outro gênero de moscas de frutas. Observações como esta foram feitas por diversos autores que trabalharam com esse tipo de análise (SCHILTHUIZEN & STOUTHAMER, 1997; WEST *et al.*, 1998; SCHILTHUIZEN & STOUTHAMER, 1998; VAN MEER *et al.*, 1999; VAVRE *et al.*, 1999; NODA *et al.* 2001; SHOEMAKER *et al.*, 2002), sendo apontado pelos mesmos que eventos de transmissão horizontal de *Wolbachia* deve ser algo muito freqüente.

Observa-se também, em concordância com outros estudos, casos em que uma mesma espécie apresenta linhagem de *Wolbachia* muito distintas entre si, o que é um outro indício de que existe transferência horizontal dessas bactérias. Isso ocorre, por exemplo, para as bactéria presentes em *Drosophila simulans*. Nota-se que uma linhagem presente nesta espécie apresenta maior semelhança com a linhagem presente em *D. sechellia*, outra com a linhagem presente em *D. willistoni*, além de uma terceira que apresenta maior semelhança com linhagens que ocorrem em organismos menos aparentados. O mesmo acontece com as diferentes amostras de *A. obliqua* que apresentam linhagens distintas que se assemelham mais a outras presentes em organismos distintos do que entre si.

Observando as topologias das árvores de consensos, vemos que algumas das linhagens que em encontramos presentes nas amostras de *Anastrepha* estudadas (w3.1, w3.2, w3.3, w5.0 e w2.0) apresentam grande semelhança com as duas linhagens encontradas previamente em outras espécie de Tephritidae, *Rhagoletis cerasi* (RIEGLER & STAUFER, 2002) wCer1 e wCer2. Destas linhagens, w3.1 e w2.0 também ocorrem nas espécies de braconídeos estudadas e, além disso, w3.0, que também apresenta grande similaridade com wCer2, foi encontrada com freqüência nas amostras dos parasitóides estudados. A presença de linhagens muito semelhantes que foram encontradas no Brasil e em outros continentes, poderia ser explicada pelo transporte destes organismos a medida que são realizadas invasões intercontinentais de seus hospedeiros (BALLARD, 2004), e ali se dispersariam entre espécies hospedeiras nativas por transferência horizontal. Tendo em vista que o grupo de organismos, os quais estas bactérias utilizam como hospedeiros, tem sido transportado por ação antrópica recente, não há grandes dificuldade em se aceitar esta hipótese.

Isso que vimos expondo nos últimos parágrafos, vem a reforçar a hipótese discutida, por diferentes autores (SCHILTHUIZEN & STOUTHAMER, 1997, 1998; WEST *et al.* 1998; HEATH *et al.*, 1999; VAN MEER *et al.* 1999; VAVRE *et al.* 1999; NODA *et al.*, 2001; SHOEMAKER *et al.*, 2002), que a relação ecológica hospedeiro/parasitóide favoreceria a transmissão destas bactérias entre espécies pertencentes a grupos taxonômicos distintos.

VI. CONCLUSÕES

- A amplificação e seqüenciamento de um fragmento do gene *wsp*, demonstrou a presença da bactéria *Wolbachia* em espécies de moscas-das-frutas e nos braconídeos parasitóides associados. Todas as vinte e uma linhagens de *Wolbachia* detectadas são pertencentes ao super-grupo A;
- Infecção por *Wolbachia* foi detectada em 93% das amostras de moscas-das-frutas. *A. serpentina* foi a única espécie analisada, na qual a bactéria não foi detectada;
- Infecção por *Wolbachia* foi detectada em 83% das amostras de vespas parasitóides associadas às moscas-das-frutas. A espécie *Asobara anastrephae* e uma amostra de *Opius bellus* não apresentaram infecção;
- As linhagens de *Wolbachia* aqui detectadas, apresentam semelhanças com outras linhagens encontradas em espécies pertencentes a táxons aparentados e também em espécies pertencentes a diferentes ordens de insetos;
- As linhagens detectadas neste trabalho possuem semelhanças com linhagens anteriormente registradas na Europa, Ásia, Austrália, África e Américas, corroborando a ampla distribuição geográfica das mesmas;
- Diferentes amostras de uma mesma espécie apresentam linhagens de *Wolbachia* distintas. Além disso, mais de uma linhagem de *Wolbachia* foi detectada em uma mesma amostra de algumas espécies. Esses casos de múltipla infecção foram observados em aproximadamente 25% das amostras estudadas;

- Com base nos grupos monofiléticos formados entre as linhagens de *Wolbachia* detectadas nesse trabalho e linhagens descritas anteriormente, reconhecemos a presença de *Wolbachia* dos grupos *Trunc*, *Mel* e *Haw*. Entretanto, para outras linhagens, não foi possível sua inclusão entre esses grupos pré-definidos;
- As congruências entre linhagens de *Wolbachia* encontradas em pares de espécies de *Anastrepha*-braconídeos, coletados numa mesma amostra, sugerem a existência de eventos de transferência horizontal (transmissão intertáxons);
- Os resultados apresentados neste trabalho sugerem a existência de eventos de transmissão destas bactérias entre espécies de *Anastrepha* que utilizam os mesmos frutos hospedeiros;
- Os resultados mostram a presença de uma mesma linhagem de *Wolbachia*, w2.0, entre espécies de braconídeos pertencentes a gêneros distintos, sugerindo que entre estas espécies de parasitóides também poderia ocorrer transmissão horizontal de *Wolbachia*.

VII. RESUMO

Amostras, de oito espécies de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* e de seis espécies de vespas (Braconidae) parasitóides à elas associadas, coletadas em diferentes localidades do Brasil, foram estudadas para uma detecção e caracterização das linhagens da bactéria endossimbionte *Wolbachia*. A detecção e identificação de *Wolbachia* foram feitas pela amplificação e seqüenciamento de um fragmento do gene *wsp* (*Wolbachia* “surface protein”). As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências depositadas no GenBank mostrando que todos os fragmentos amplificados e seqüenciados eram realmente provenientes de *Wolbachia*. Das espécies de *Anastrepha*, infecção pela *Wolbachia* foi encontrada em *A. amita*, *A. obliqua*, *A. macrura*, *A. montei*, *A. picklei*, *A. sp.1 aff. fraterculus* e *A. sp.2 aff. fraterculus*, exceto na amostra de *A. serpentina*. Dentre as seis espécies e braconídeos estudados, apenas as duas amostras de *Asobara anastrephae* e uma amostra de *Opius bellus*, não apresentaram infecção. Já as oito amostras de *Doryctobracon areolatus*, duas de *D. brasiliensis*, uma de *D. fluminensis*, três de *Opius bellus* e cinco de *Utetes anastrephae* apresentaram-se infectadas por essas bactérias. Foram identificadas 21 linhagens distintas de *Wolbachia*, sendo oito mais divergentes e as demais apresentando pequenas variações. Duas amostras de *A. obliqua* estavam infectadas com mais de uma linhagem de *Wolbachia*, enquanto que as demais espécies de *Anastrepha* abrigavam apenas uma linhagem da bactéria. Entre os braconídeos, quatro amostras populacionais de *U. anastrephae* e uma de *D. brasiliensis* apresentaram múltipla infecção, enquanto que as demais espécies exibiram apenas uma única linhagem de *Wolbachia* associada. Foram detectadas linhagens distintas da bactéria entre diferentes amostras de uma mesma espécie, assim como, uma mesma linhagem bacteriana está presente em populações de mais de uma espécie do himenóptero. *U. anastrephae* foi detectada parasitando quatro diferente espécies de *Anastrepha*, tendo sido observado que a mesma linhagem de *Wolbachia* que infectava as moscas-das-frutas também infectava o parasitóide. Além disso, a análise filogenética indicou que as bactérias *Wolbachia* que infectam os braconídeos aqui estudados exibem uma alta similaridade com linhagens presentes em insetos não relacionados taxonomicamente mas que, em alguns casos, habitam regiões neotropicais. O conjunto de resultados sugere que eventos de transferência horizontal das bactérias entre esses insetos possam ter ocorrido.

VIII. SUMMARY

Detection and characterization of infection by the bacteria *Wolbachia* were done in samples of eight species of the fruit fly *Anastrepha* and six species of their parasitoid wasps (Braconidae), collected in several localities in Brazil. The presence and identification of the *Wolbachia* strains were performed by amplification and sequencing of a fragment of the *Wolbachia* *wsp* gene. Comparisons of the sequences with the data on the GenBank confirmed that the amplified fragments were from *Wolbachia*. The endosymbiont was found in *Anastrepha amita*, *A. obliqua*, *A. macrura*, *A. montei*, *A. picklei*, *A. sp.1 aff. fraterculus* e *A. sp.2 aff. fraterculus*, but not in the sample of *A. serpentina*. Among the six species of braconids only samples of *Asobara anastrephae* and one sample of *Opius bellus* were not infected. The eight samples of *Doryctobracon areolatus*, two of *D. brasiliensis*, one of *D. fluminensis*, three of *Opius bellus* and five of *Utetes anastrephae* were infected by these bacteria. Twenty one distinct strains of *Wolbachia* were detected, eight of which having a higher level of distinctiveness than the others, which showed slight variation. Two out of the four samples of *Anastrepha obliqua* were infected by more than one strain of *Wolbachia*, while a single strain of bacteria was found in the other *Anastrepha* species. Among the braconids, four samples of *U. anastrephae* and one sample of *D. brasiliensis* showed multiple infection, and single strains of *Wolbachia* were found in the other species of parasitoids. It was found that a same strain of *Wolbachia* may be present in different host species, either fruit fly or the parasitoids, as well as, that the same host species may present different strains of bacteria. The braconid *U. anastrephae* was found parasiting four different species of *Anastrepha*, and in every case and samples, the same *Wolbachia* strain was found in both, the fruit fly and its parasitoid. Moreover, a phylogenetic analysis indicated that the *Wolbachia* strains infecting the fruit flies and the parasitoid wasps here studied showed a high similarity to strains present in other phylogenetic non-related insects, some of which inhabiting neotropic regions. The data suggest that horizontal transfer of *Wolbachia* might have occurred in these two groups of insects.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON C. L.; KARR T. L. *Wolbachia*: Evolutionary novelty in a rickettsial bacteria. **BMC Evolutionary Biology**, v.1, n. 10, 2001.
- BALLARD, J. W. Sequential Evolution of a symbiont inferred from the host: *Wolbachia* and *Drosophila simulans*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 21, n. 3, p. 428-442, 2004.
- BOUCHON, D.; RIGAUD, T.; JUCHAULT, P. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: Molecular identification and host feminization. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 265, p. 1081-1090, 1998.
- BOYLE, L.; O'NEILL, S. L.; ROBERTSON, H. M.; KARR, T. L. Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. **Science**, v. 260, p. 1796-1799, 1993.
- BRAIG, H. R.; GUZMAN, H.; TESH, R. B.; O'NEILL, S. L. Replacement of natural *Wolbachia* symbionts of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart. **Nature**, v. 367, p. 453-455, 1994.
- BREEUWER, J. A. J.; JACOBS, G. *Wolbachia*: intracellular manipulators of mite reproduction. **Exp. Appl. Acarol**, v.20, p. 421-434, 1996.
- BREEWER, J. A. J., STOUTHAMER, R., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A., WEISBURG, W. G. E WERREN, J. H. Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera, Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. **Insect Mol. Biol.**, v. 1, p. 25-36, 1992.
- CANAL, N. A.; ZUCCHI, R. A. Parasitóides - Braconidae. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.) **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto-SP: Holos Editora, 2000, p. 119-126.
- CHARLAT, S.; HURST, G. D. D.; MERCOT, H. Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. **TIG**, v. 19, p. 217-223, 2003.

- CLAUSEN, C.P.. Tephritidae (Trypetidae, Trupaneidae),. In: CLAUSEN, C.P. (Ed.). **Introduced parasites and predators of arthropod pests and weeds: a world review**. Washington: USDA Handbook, 1978, p. 320-325
- CORDAUX, R.; MICHEL-SALZAT, A.; BOUCHON, D. *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. **J. Evol. Biol.**, v. 14, p. 237-243, 2001.
- COSCRATO, V. E. **Detecção e filogenia da bactéria *Wolbachia* em moscas-das-frutas *Ceratitis capitata* e em espécies de *Anastrepha* (Diptera, Tephritidae)**. 93p. Tese de Doutorado - Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, 2006.
- DA COSTA LIMA, A. Vespas parasitas de moscas de frutas (Hymenoptera: Braconidae). **O Campo**, v. 9, p. 69-72, 1938.
- DE LAET, J; WHEELER W. (2003) POY version 3.0.11 (Wheeler, Gladstein and De Laet, May 6 2003). Command line documentation.
- DEDEINE, F.; AHRENS, M.; CALCATERRA, L.; SHOEMAKER, D. D. Social parasitism in fire ants (*Solenopsis* spp.): a potential mechanism for interspecies transfer of *Wolbachia*. **Mol. Ecol.**, v. 14, p. 1543-1548, 2005.
- DOBSON, S. L.; BOURTZIS, K.; BRAIG, H. R.; JONES, B. F.; ZHOU, W.; ROUSSET, F.; O' NEILL, S. L.. *Wolbachia* infection are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. **Insect Bioch. Mol. Biol.**, v. 29, p. 153-160, 1999.
- FIALHO, R. F.; STEVENS, L., Male-killing *Wolbachia* in a flour beetle. **Proc. R. Soc. Lond. Ser. B**, v. 267, p. 1469-1473, 2000.
- GIRIBET, G. Exploring the Behavior of POY, a Program for Direct Optimization of Molecular Data. **Cladistics**, v. 17, p. S60-S70, 2001.
- GODFRAY, H. C. J. **Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology**. Princeton: Princeton University Press., 1994, 488 p.
- GUIMARÃES, J. A.; DIAZ, N. B.; ZUCCHI, R. A.. Parasitóides - Figitidae (Eucoilinae). In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.) **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. 1. ed. Ribeirão Preto-SP: Holos Editora, 2000, p. 127-134.

- HEATH, D. B.; BUTCHER, R. D. J.; WHITFIELD, W. G. F.; HUBBARD, S. F.
Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by naturally occurring mechanism. **Current Biology**, v. 9, p. 313-316, 1999.
- HERTIG M.; WOLBACH S. B. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. **J. Med. Res.** **44**, v. 44, p. 329-374, 1924.
- HERTIG, M. The rickettsia, *Wolbachia pipientis* and associated inclusions of the mosquito *Culex pipiens*. **Parasitology**, v. 28, p. 453-486, 1936.
- HURST, G. D. D., JIGGINS, F. M., VON DER SCHULENBURG, J. H. G., BERTRAND. D., WEST, S. A., GORIACHEVA, I. I., ZAKHAROV, I. A., WERREN, J. H., STOUTHAMER, R., MAJERUS, M. E. N. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 266, p. 735-740, 1999.
- HURST, G. D. 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**, v. 156, p. 699-709, 2000.
- JIGGINS, F. M.; HURST, G. D. D.; MAJERUS. M. E. N. Sex-ratio-distorting *Wolbachia* causes sex-role reversal in its butterfly host. **Proc. R. Soc. Lond. B.**, v. 267, p. 69-73, 2000.
- JOHANOVICZ, D. L; HOY, M. A. *Wolbachia* in a predator-pray system: 16S ribosomal DNA analysis of two phytoseiids (Acari: Phytoseiidae) and their pray (Acari: Tetranychidae). **Genetics**, v. 89, p. 435-441, 1996.
- JOWETT T. Preparation of nucleic acids. In: ROBERTS, D. B. (Ed.). **Drosophila: A Practical Approach**. Oxford: Press, Oxford, 1986, p. 275-286.
- JUCHAULT, P.; FRELON, M.; BOUCHNON, D.; RIGAUD, T. New evidence for feminizing bacteria in terrestrial isopods: evolutionary implications. **C. R. Acad. Sci. Paris life Sci**, v. 317, p. 225-230, 1994
- KITTAYAPONG P., JAMNONGLUK, W., THIPAKSORN., A., MILNE, J.R. & SINDHUSAKE, C. *Wolbachia* infection complexity among insect in the tropical rice-field community. **Mol. Ecol.**, v. 12, p. 1049-1060, 2003.

- KITTAYAPONG P.; BAISLEY, K. J.; BAIMAI, V.; O'NEILL, S. L. Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in southeast asian mosquitoes (Diptera: Culicidae). **J Med Entomol**, v. 37, p. 340–345, 2000a.
- KITTAYAPONG, P.; MILNE, J.R.; TIGVATTANANONT, S.; BAIMAI, V. (2000b). Distribution of the Reproduction-modifying bacteria, *Wolbachia*, in natural populations of tephritid fruit flies in Thailand. **ScienceAsia**, v. 26, p. 93-103.
- KYEI-POKU, G.K.; COLWELL, D.D.; COGHLIN, P.; FLOATE, K.D. On the ubiquity and phylogeny of *Wolbachia* in lice. **Mol. Ecol.**, v. 14, p. 285-294, 2005.
- LAVAGNOLLI, T. M. C.; MASCARENHAS, R. O.; ROCHA, L. S.; PERONDINI, A. L. P.; 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. Eradication of *Culex pipiens fustigans* through cytoplasmic incompatibility. **Nature**, v. 261, p. 383-384, 1967
- MILLER, W.J.; RIEGLER, M. Evolutionary dynamics of *wAu*-like *Wolbachia* variants in neotropical *Drosophila* spp. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 72, n. 1, p. 826-835, 2006.
- NODA, H.; MIYOSHI, T.; ZHANG, Q.; WATANABE, K.; DENG, K.; HOSHIZAKI, S. *Wolbachia* infection shared among planthoppers (Homoptera: Delphacidae) and their endoparasites (Strepsiptera: Elenchidae): a probable case of interspecies transmission. **Mol. Ecol.**, v. 10, p. 2101-2106, 2001.
- 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. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, v. 89, p. 2649-2702, 1992.
- OVRUSKI, S.M.; ALUJA, M.; SIVINSKI, J.; WHARTON, R.A. Hymenopteran parasitoids on fruit-infesting Tephritidae (Diptera) in Latin America and the southern United States: diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. **Integ. Pest Manag. Rev**, v. 5, p. 81-107, 2000.

- PEROTTI, M.A.; CATALÁ, S.S.; ORMEÑO A. DEL V.; ZELAZOWSKA, M.; BILINSKI, S.M.; VARIG, H.R. The sex ratio distortion in the human head louse is conserved over time. **BMC Genetics**, v. 5, n. 10, p. 1471-1483, 2004.
- PHILLIPS, A.; JANIES, D; WHEELER W. C. Multiple Sequence Alignment in Phylogenetic Analysis. **Mol. Phylog. Evol.** v. 16, n. 3, p. 317-330, 2000.
- RIEGLER, M.; STAUFER, C. *Wolbachia* infections and superinfections in cytoplasmically incompatible populations of the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tethritidae). **Mol. Ecol.** v. 11, p. 2425-2434, 2002.
- RIGAUD, T.; JUCHAULT, P. Success and failure of horizontal transfers of feminizing *Wolbachia* endosymbionts in woodlice. **J. Evol. Biol.** v. 8, n. 2, p. 249-255, 1995.
- RIGAUD, T.; SOUTY-GROSSET, C.; RAIMOND, R.; MOCQUARD, J. P.; JUCHAULT, P. Feminization endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda): recent acquisitions. **Endocyt. Coll. Res**, v. 7, p. 259-273, 1991.
- ROCHA, L.S.; MASCARENHAS, R.O.; PERONDINI, A.L.P.; SELIVON, D. Occurrence of *Wolbachia* in brazilian samples of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera, Tephritidae). **Neotrop. Entomol.**, v. 32, p. 527-529, 2005.
- ROKAS, A. *Wolbachia* as a speciation agent. **TREE**, v. 15, p. 44-45, 2000.
- ROUSSET, F.; BOUCHON, D.; PINTUREAU, B.; JUCHAULT, P.; SOLIGNAC, M. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. **Proc. R. Soc. Lond. B.**, v. 250, p. 91-98, 1992.
- SCHILTHUIZEN, M.; STOUTHAMER R. Horizontal transmission of parthenogenesis-inducing microbes in *Trichogramma* wasps. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 264, p. 361-366, 1997.
- SCHILTHUIZEN, M.; STOUTHAMER, R. Distribution of *Wolbachia* among the guild associated with the parthenogenetic gall wasp *Diplolepis roseae*. **Heredity**, v. 81, p. 270-274, 1998.
- SELIVON, D.; MORGANTE, J. S.; RIBEIRO, A. F.; PERONDINI, A. L. P., Extrusion of masses of yolk during embryonary development of the fruit fly *Anastrepha fraterculus*. **Invertebr. Reprod. Dev.**, v. 29, p. 1-7, 1996.

- SELIVON, D.; PERONDINI, A. P.; RIBEIRO, A. F.; MARINO, C. L.; LIMA, M. M. A.; COSCRATO, V. E. *Wolbachia* endosymbionts in a species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). **Invertebr. Reprod. Dev.**, v. 42, p. 121-127, 2002.
- 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. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 269, p. 2257-2267, 2002.
- SINTUPACHEE, S.; MILNE, J. R.; POONCHAI S.; BAIMAI, V.; KITTAYAPONG, P. Closely related *Wolbachia* strains within the pumpkin arthropod community and the potential for horizontal transmission via the plant. **Microb. Ecol**, v. 51, p. 294-301, 2006.
- SIRONI, M.; BANDI, C.; SACCHI, L.; DI DACCO, B.; DAMIANI, G.; GENCHI, C. Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. **Mol. Biochem. Parasitol**, v. 74, p. 223-227, 1995.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**, 2. ed. San Francisco: Freeman, 1981, 859 p.
- STOUTHAMER, R.; BREWER, J. A. J.; LUCK, R. F.; WERREN, J. H. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. **Nature**, v. 361, p. 66-68, 1993.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. 1994, CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix.
- UCHÔA-FERNANDES, M. A.; MOLINA R. M.; OLIVEIRA, I.; ZUCCHI, R. A.; CANAL, N. A.; DÍAZ, N. B. Larval endoparasitoids (Hymenoptera) of frugivorous flies (Diptera, Tephritoidea) reared from fruits of the cerrado of the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev. Brasil. Entomol.**, v. 47, n. 2, p. 181-186, 2003.
- VAN MEER, M.M.M., WITTEVELDT, J., STOUTHAMER, R. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on *wsp* gene. **Insect Mol. Biol.** v. 8, p. 399-408, 1999.

- VAVRE, F.; FLEURY, F.; LEPETIT, D.; FOUILLET, P.; BOULÉTREAU, M. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. **Mol. Biol. Evol.**, v. 16, p. 1711-1723, 1999.
- WADE, M. J.; STEVENS, L. Microorganism mediated reproductive isolation in flour beetles (genus *Tribolium*). **Science**, v. 278, p. 527-528, 1985.
- WENSELEERS, T.; ITO, F.; VAM BORM, S.; HUYBRECHTS, R.; VOLCKAERT, F. E.; BILLEN, J. Widespread occurrence of micro-organism *Wolbachia* in ants. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 265, p. 1447-1452, 1998.
- WERREN, J. H. Biology of *Wolbachia*. **Annu. Rev. Entomol**, v. 42, p. 587-609, 1997.
- WERREN, J. H.; O'NEILL, S. L. The evolution of heritable symbionts. In: O'NEILL, S. L.; HOFFMANN, A. A.; WERREN, J. H. (Ed.) **Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction**. Oxford: Oxford University Press, 1997, p. 1-41.
- WERREN, J. H.; WINDSOR, D. M. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of global equilibrium?, **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 267, p. 1277-1285, 2000.
- WERREN, J. H.; WINDSOR, D.; GUO, L. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 262, p. 197-204, 1995b.
- WERREN, J. H.; ZHANG, W.; GUO, L. R. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 251, p. 55-71, 1995a
- WEST, S.A.; COOK, J. M.; WERREN, J. H.; GODFRAY, H. C. J. *Wolbachia* in two insect host-parasitoid communities. **Mol. Ecol.**, v. 7, p. 1457-1465, 1998.
- WHARTON, R.A. Classical biological control of fruit-infesting Tephritidae. In: ROBINSON, A.S. & HOOPER G. (Ed.) **Fruit, flies, their biology, natural enemies and control. World Crop Pest**. Amstredam: Elsevier, 1989, V.3B, p. 303-313.
- WHARTON, R.A., GILSTRAP, F.E., RHODE, R.H., FISCHER, M.& HART. W.G. Hymenopterous egg-pupal and larval-pupal parasitoids of *Ceratitidis capitata* and *Anastrepha* spp. (Dip.: Tephritidae) in Costa Rica. **Entomophaga**, v. 26, n. 3, p. 285-290, 1981.

- WHEELER, W. C.. Implied alignment: a synapomorphy-based multiple-sequence alignment method and its use in cladogram search. **Cladistics**, v. 19, p. 261-268, 2003.
- WHITE, I. M.; ELSON-HARRIS, M. M. **Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics**. Wallingford, UK, CAB International, 1992, 601 p.
- YEN, J. H.; BARR, A. R. New Hypothesis of the Cause of Cytoplasmic Incompatibility in *Culex pipiens* L **Nature**, v. 232, p. 657-658, 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. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 101, n. 42, p. 15042-15045, 2004.
- ZHOU, W.; ROUSSET, F.; O'NEILL, S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 265, p. 509-515, 1998.
- ZUCCHI, R. A. Espécies de *Anastrepha*, Sinonímias, Plantas Hospedeiras e Parasitóides. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.) **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. 1. Ed. Ribeirão Preto-SP: Holos Editora, 2000, p. 41-48.

w4.1

TAGCTACTACGTTTCGTTTGCAATACAACGGTGAAATTTTACCTCTTTTCACAAAAGTTGATGGTATTAC----
 CTATAAGAAAGAC----AAGAGTGAT-

w5.0

TAGCTACTACGTTTCGTTTGCAATACAACGGTGAAATTTTACCTCTTTTCACAAAAGTTGATGGTGCTACAGTGCT
 AAAAAGAAGACTGCCGATACTGATA

w6.0

TAGCTACTACGTTTCGTTTGCAATACAACGGTGAAATTTTACCTCTTTTCACAAAAGTTGATGGTATTAC----
 CTATAAGAAAGAC----AAGAGTGAT-

w7.0

TAGCTACTACGTTTCGTTTGCAATACAACGGTGAAATTTTACCTCTTTTCATAAAAGTTGATGGTATTAC----
 CTATAAGAAAGAC----AAGAGTGAT-

w8.0

TAGCTACTACGTTTCGTTTGCAATACAACGGTGAAATTTTACCTCTTTTCACAAAAATTGAAGGTATTGAAT--
 ATAAAAAGGCCACA---GACATTCAT-

w8.1

TAGCTACTACGTTTCGTTTGCAATACAACGGTGAAATTTTACCTCTTTTCACAAAAATTGAAGGTATTGAAT--
 ATAAAAAGGCCACA---GACATTCAT-

170 180 190 200 130 140 150 160

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
|....|....|....|....|

w1.0 -----GATCCTTTT-
 AAAGCTTCTTTTATAGGAGGTGGTGCCGCATTTGGTTATAAAATGGACGACATTAGAGTTGATATTGAAGGGCTA
 TATTCACA

w1.1 -----GATCCTTTT-
 AAAGCTTCTTTTATAGGAGGCGGTGCCGCATTTGGTTATAAAATGGACGACATTAGAGTTGATATTGAAGGGCTA
 TATTCACA

w1.2 -----GATCCTTTT-
 AAAGCTTCTTTTATAGGAGGTGGTGCCGCATTTGGTTATAAAATGGACGACATTAGAGTTGATATTGAAGGGCTA
 TATTCACA

w1.3 -----GATCCTTTT-
 AAAGCTTCTTTTATAGGAGGTGGTGCCGCATTTGGTTATAAAATGGACGACATTAGAGTTGATATTGAAGGGCTA
 TATTCACA

w1.4 -----GATCCTTTT-
 AAAGCTTCTTTTATAGGAGATGGTGCCGCATTTGGTTATAAAATGGACGACATTAGAGTTGATATTGAAGGGCTA
 TATTCACA

w1.5 -----GATCCTTTT-
 AAAGCTTCTTTTATAGGAGGTGGTGCCGCATTTGGTTATAAAATGGACGACATTAGAGTTGATATTGAAGGGCTA
 TATTCACA

w1.6 -----GATCCTTTT-
 AAAGCTTCTTTTATAGGAGGTGGTGCCGCATTTGGTTATAAAATGGACGACATTAGAGTTGATATTGAAGGGCTA
 TATTCACA

w1.7 -----GATCCTTTT-
 AAAGCTTCTTTTATAGGAGGTGGTGCCGCATTTGGTTATAAAATGGACGACATTAGAGTTGATATTGAAGGGCTA
 TATTCACA

w1.8 -----GATCCTTTT-
 AAAGCTTCTTTTATAGGAGGTGGTGCCGCATTTGGTTATAAAATGGACGACATTAGAGTTGATATTGAAGGGCTG
 TATTCACA

w2.0

CAACTACTGACCTTTTATAAACCTTCCTTTTATGGCTGGTGGTGGTGCAATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGAG
 TTGATGTTGAAGGGCTTTATTTCGCA

w3.0 ----TACAGTCCATTA-

AAACCATCTTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCAATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTT
 TATTCATA

w3.1 ----TACAGTCCATTA-
AAACCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTT
TATTCATA

w3.2 ----TACAGTCCATTA-
AAACCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTT
TATTCATA

w3.3 ----TACAGTCCATTA-
AAACCATATTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTT
TATTCATA

w4.0 ----TACAGTCCATTA-
AAACCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTT
TATTCATA

w4.1 ----TACAGTCCATTA-
AAACCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTT
TATTCATA

w5.0
CAACTACTGACCCTTTATAAACCTTCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGG
TTGATGTTGAAGGAGTTTATTCATA

w6.0 ----TACAGTCCATTA-
AAACCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGAGTTGATGTTGAAGGGCTT
TATTCGCA

w7.0 ----TACAGTCCATTA-
AAACCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTT
TATTCATA

w8.0 -----AATCCATTA-
AAAGCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCCTTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTT
TATTCATA

w8.1 -----AATCCATTA-
AAAGCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCCTTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTT
TATTCATA

270 280 290 300 230 240 250 260

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
....|....|....|....|....|
w1.0 GCTAAACAAGAAATGTGAACAATGATGAAGTGCTTACTCCAG---
ATACTGTTGCGGGCAGCTTAAACAGCAATTTT CAGGGCTAGTTAACGTTTATTACGAT
w1.1 GCTAAACAAGAAATGTGAACAATGATGAAGTGCTTACTCCAG---
ATACTGTTGCGGGCAGCTTAAACAGCAATTT CAGGGCTAGTTAACGTTTATTACGAT
w1.2 GCTAAACAAGAAATGTGAACAATGATGAAGTGCTTACTCCAG---
ATACTGTTGCGGGCAGCTTAAACAGCAATTT CAGGGCTAGTTAACGTTTATTACGAT
w1.3 GCTAAACAAGAAATGTGAACAATGATGAAGTGCTTACTCCAG---
ATACTGTTGCGGGCAGCTTAAACAGCAATTT CAGGGCTAGTTAACGTTTATTACGAT
w1.4 GCTAAACAAGAAATGTGAATAATGATGAAGTGCTTACTCCAG---
ATACTGTTGCGGGCAGCTTAAACAGCAATTT CAGGGCTAGTTAACGTTTATTACGAT
w1.5 GCTAAACAAGAAATGTGAACAATGATGAAGTGCTTACTCCAG---
ATACTGTTGCGGGCAGCTTAAACAGCAATTT CAGGGCTAGTTAACGTTTATTACGAT
w1.6 GCTAAACAAGAAATGTGAACAATGATGAAGTGCTTACTCCAG---
ATACTGTTGCGGGCAGCTTAAACAGCAATTT CAGGGCTAGTTAACGTTTATTACGAT
w1.7 GCTAAACAAGAAATGTGAACAATGATGAAGTGCTTACTCCAG---
ATACTGTTGCGGGCAGCTTAAACAGCAATTT CAGGGCTAGTTAACGTTTATTACGAT
w1.8 GCTAAACAAGAAATGTGAACAATGATGAAGTGCTTACTCCAG---
ATACTGTTGCGGGCAGCTTAAACAGCAATTT CAGGGCTAGTTAACGTTTATTACGAT
w2.0 GCTAAGCAAGGATACACTT---GATGTAGCTCCTACTCCAGCAA-----
TTGCAGACAGTTTAAACAGCAATTTT CAGGATTAGTTAACGTTTATTACGAT
w3.0


```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
.....|.....|.....|.....|.....|
w1.0   TGCTAATTTCGAT--AAAAGCGGTGG-----TGAGAAA-----
GACAAAGGAGGACATACAGTCCTTTACAGCACTGTTGGTGC
w1.1   TGCTAATTTCGAT--AAAAGCGGTGG-----TGAGAAA-----
GACAAAGGAGGACATACAGTCCTTTACAGCACTGTTGGTGC
w1.2   TGCTAATTTCGAT--AAAAGCGCTGG-----TGAGAAA-----
GACAAAGGAGGACATACAGTCCTTTACAGCACTGTTGGTGC
w1.3   TGCTAATTTCGAT--AAAAGCGGTGG-----TGAGAAA-----
GACAAAGGAGGACATACAGTCCTTTACAGCACTGTTGGTGC
w1.4   TGCTAATTTCGAT--AAAAGCGGTGG-----TGAGAAA-----
GACAAAGGAGGACATACAGTCCTTTACAGCACTGTTGGTGC
w1.5   TGCTAATTTCGAT--AAAAGCGGTGG-----TGAGAAA-----
GACAAAGGAGGACATACAGTCCTTTACAGCACTGTTGGTGC
w1.6   TGCTAATTTCGAT--AAAAGTGGTGG-----TGAGAAA-----
GACAAAGGAGGACATACAGTCCTTTACAGCACTGTTGGTGC
w1.7   TGCTAATTTCGAT--AAAAGCGGTGG-----TGAGAAA-----
GACAAAGGAGGACATACAGTCCTTTACAGCACTGTTGGTGC
w1.8   TGCTAATTTCGAT--AAAAGCGGTGG-----TGAGAAA-----
GACAAAGGAGGACATACAGTCCTTTACAGCACTGTTGGTGC
w2.0   TGCTCATTTTGAT--AAAGTACTG--CTGCAG--CAAGCAA-----
GACAAGGGGGAACTCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGC
w3.0
TGCTAATTTTGATGGAAAAAAAAACAGATCCTAAAGATTCAACCAGACAGGTTACTGATGCAGGCGCATACAAAGT
TCTTTACAGCACTGTTGGTGC
w3.1
TGCTAATTTTGATGGAAAAAAAAACAGATCCTAAAGATTCAACCAGACAGGTTACTGATGCAGGCGCATACAAAGT
TCTTTACAGCACTGTTGGTGC
w3.2
TGCTAATTTTGAGGAAAAAAAAACAGATCCTAAAGATTCAACCAGACAGGTTACTGATGCAGGCGCATACAAAGT
TCTTTACAGCACTGTTGGTGC
w3.3
TGCTAATTTTGATGGAAAAAAAAACAGATCCTAAAGATTCAACCAGACAGGTTACTGATGCAGGCGCATACAAAGT
TCTTTACAGCACTGTTGGTGC
w4.0   TGCTCATTTTGAT--AAAGTACTG--CTGCAG--CAAGCAA-----
GACAAGGGGGAACTCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGC
w4.1   TGCTCATTTTGAT--AAAGTACTG--CTGCAG--CAAGCAA-----
GACAAGGGGGAACTCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGC
w5.0
TGCTAATTTTGATGGAAAAAAAAACAGATCCTAAAGATTCAACCAGACAGGTTACTGATGCAGGCGCATACAAAGT
TCTTTACAGCACTGTTGGTGC
w6.0   TGCTCATTTTGAT--AAAGTACTG--CTGCAG--CAAGCAA-----
GACAAGGGGGAACTCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGC
w7.0   TGCTCATTTTGAT--AAAGTACTG--CTGCAG--CAAGCAA-----
GACAAGGGGGAACTCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGC
w8.0   TGCTAATTTCGAT--AAAAGCGGTGG-----TGAGAAA-----
GACAAAGGAGGACATACAGTCCTTTACAGCACTGTTGGTGC
w8.1
          TGCTAATTTCGAT--AAAAGCGGTGG-----TGAGAAA-----
GACAAAGGAGGACATACAGTCCTTTACAGCACTGTTGGTGC

```

Anexo II – Alinhamento de seqüências de DNA editadas e utilizadas na construção de árvores filogenéticas. Os números indicam cada uma das 5 (cinco) partições em que este alinhamento prévio foi subdividido para posterior análise em POY.

GCTATATTCAC
 w1.3 -----
 TGTGATCCTTTTAAAGCTTCTTTATAGGAGGTGGTCCGCATTTGGTTATAAAATGGACGACATTAGAGTTGATATTGAAGG
 GCTATATTCAC
 w1.4 -----
 TGTGATCCTTTTAAAGCTTCTTTATAGGAGATGGTCCGCATTTGGTTATAAAATGGACGACATTAGAGTTGATATTGAAGG
 GCTATATTCAC
 w1.5 -----
 TGTGATCCTTTTAAAGCTTCTTTATAGGAGGTGGTCCGCATTTGGTTATAAAATGGACGACATTAGAGTTGATATTGAAGG
 GCTATATTCAC
 w1.6 -----
 TGTGATCCTTTTAAAGCTTCTTTATAGGAGGTGGTCCGCATTTGGTTATAAAATGGACGACATTAGAGTTGATATTGAAGG
 GCTATATTCAC
 w1.7 -----
 TGTGATCCTTTTAAAGCTTCTTTATAGGAGGTGGTCCGCATTTGGTTATAAAATGGACGACATTAGAGTTGATATTGAAGG
 GCTATATTCAC
 w1.8 -----
 TGTGATCCTTTTAAAGCTTCTTTATAGGAGGTGGTCCGCATTTGGTTATAAAATGGACGACATTAGAGTTGATATTGAAGG
 GCTGATTCAC
 w2.0
 ACAACTACTGACCTTTATAAACCTTCTTTATAGGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGAGTTGATGTT
 GAAGGGCTTTATTCGC
 w3.0 -----TACAGTCCATTA-
 AAACCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTTTATTCAT
 w3.1 -----TACAGTCCATTA-
 AAACCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTTTATTCAT
 w3.2 -----TACAGTCCATTA-
 AAACCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTTTATTCAT
 w3.3 -----TACAGTCCATTA-
 AAACCATATTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTTTATTCAT
 w4.0 -----TACAGTCCATTA-
 AAACCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTTTATTCAT
 w4.1 -----TACAGTCCATTA-
 AAACCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTTTATTCAT
 w5.0
 ACAACTACTGACCTTTATAAACCTTCTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTT
 GAAGGAGTTTATTCAT
 w6.0 -TGATTACAGTCCATTA-
 AAACCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGAGTTGATGTTGAAGGGCTTTATTCGC
 w7.0 -----TACAGTCCATTA-
 AAACCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTTTATTCAT
 w8.0 -----TCATAATCCATTA-
 AAAGCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTTTATTCAT
 w8.1 -----TCATAATCCATTA-
 AAAGCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTTTATTCAT
 AF418556
 ACAACTACTGACCTTTATAAAAGCTTCTTTATAGGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGAGTTGATGTT
 GAAGGGCTTTATTCGC
 AF020067 -----TACAGTCCATTA-
 AAACCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTTTATTCAT
 AY620229 -----TACAGTCCATTA-
 AAACCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTTTATTCAT
 AF020075
 ACAACTACTGACCTTTATAAAAGCTTCTTTATAGGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGAGTTGATGTT
 GAAGGGCTTTATTCGC
 AF020068
 ACAACTACTGACCTTTATAAAAGCTTCTTTATAGGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGAGTTGATGTT
 GAAGGGCTTTATTCGC
 AF020077 --AAGGATAGTCCCTTA-
 AAAGCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTATAAAATGGACGACATCAGGGTTGACGTTGAAGGGCTTTACTCAC
 AF020071 -TGATTACAGTCCATTG-
 AAAGCGTCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTTTATTCAT
 AY157680 -----TCATAATCCATTA-

w1.8 AGCTAAACAAGAAATGTGAACAATGATGAAGTGCTTACTCCAG---
 ATACTGTTGCGGGCAGCTTAAACAGCAATTTAGGGCTAGTTAACGTTTATTACGA

w2.0 AGCTAAGCAAG--GATACACTTGATGTAGCTCCTACTCCAG-----
 CAATTGCAGACAGTTTAAACAGCATTTTCAGGATTAGTTAACGTTTATTACGA

w3.0
 ACCTAAACAATAATGATGTTAAAGATGTAAACATTTGACYCAGCAAACTATTGCAGACAGTGTAAACAGCAATTTTCAGGATTAG
 TGAACGTGTATTACGA

w3.1
 ACCTAAACAATAATGATGTTAAAGATGTAAACATTTGACCCAGCAAACTATTGCAGACAGTGTAAACAGCAATTTTCAGGATTAG
 TGAACGTGTATTACGA

w3.2
 ACCAAAACAATAATGATGTTAAAGATGTAAACATTTGACCCAGCAAACTATTGCAGACAGTGTAAACAGCAATTTTCAGGATTAG
 TGAACGTGTATTACGA

w3.3
 ACCTAAACAATAATGATGTTAAAGATGTAAACATTTGACCCAGCAAACTATTGCAGACAGTGTAAACAGCAATTTTCAGGATTAG
 TGAACGTGTATTACGA

w4.0
 ACCTAAACAATAATGATGTTAAAGATGTAAACATTTGACCCAGCAAACTATTGCAGACAGTGTAAACAGCAATTTTCAGGATTAG
 TGAACGTGTATTACGA

w4.1
 ACCTAAACAATAATGATGTTAAAGATGTAAACATTTGACCCAGCAAACTATTGCAGACAGTGTAAACAGCAATTTTCAGGATTAG
 TGAACGTGTATTACGA

w5.0
 ACCTAAACAATAATGATGTTAAAGATGTAAACATTTGACCCAGCAAACTATTGCAGACAGTGTAAACAGCAATTTTCAGGATTAG
 TGAACGTGTATTACGA

w6.0 AGCTAAGCAAG--GATACACTTGATGTAGCTCCTACTCCAG-----
 CAATTGCAGACAGTTTAAACAGCATTTTCAGGATTAGTTAACGTTTATTACGA

w7.0
 ACCTAAACAATAATGATGTTAAAGATGTAAACATTTGACCCAGCAAACTATTGCAGACAGTGTAAACAGCAATTTTCAGGATTAG
 TGAACGTGTATTACGA

w8.0 ACCTAAACAATAATGATGTTACAGATGCAAAAATTTACGCCAG---
 ATACTATTGCAGACAGTTTAAACAGCAATTTAGGGCTAGTTAACGTTTATTACGA

w8.1 ACCTAAACAATAATGATGTTACAGATGCAAAAATTTACGCCAG---
 ATACTATTGCAGACAGTTTAAACAGCAATTTAGGGCTAGTTAACGTTTATTACGA

AF418556 AGCTAAGCAAG--GATACACTTGATGTAGCTCCTACTCCAG-----
 CAATTGCAGACAGTTTAAACAGCATTTTCAGGATTAGTTAACGTTTATTACGA

AF020067
 ACCTAAACAATAATGATGTTAAAGATGTAAACATTTGACCCAGCAAACTATTGCAGACAGTGTAAACAGCAATTTTCAGGATTAG
 TGAACGTGTATTACGA

AY620229
 ACCTAAACAATAATGATGTTAAAGATGTAAACATTTGACCCAGCAAACTATTGCAGACAGTGTAAACAGCAATTTTCAGGATTAG
 TGAACGTGTATTACGA

AF020075 AGCTAAGCAAG--GATACACTTGATGTAGCTCCTACTCCAG-----
 CAATTGCAGACAGTTTAAACAGCATTTTCAGGATTAGTTAACGTTTATTACGA

AF020068 AGCTAAGCAAG--GATACACTTGATGTAGCTCCTACTCCAG-----
 CAATTGCAGACAGTTTAAACAGCATTTTCAGGATTAGTTAACGTTTATTACGA

AF020077 AGTTGAATAAA--GATGCA--GGTGTAGCAGGTA--A-----
 CAGTTGCAGATAAATTTAAACAGCAATTTTCAGGATTAGTTAACGTTTATTACGA

AF020071 ACCTAAACAATAATGATGTTACAGATGCAAAAATTTACGCCAGA---
 TGTATTGCAGACAGTTTAAACAGCAATTTTCAGGACTAGTTAACGTTTATTACGA

AY157680 AGCTAAACAATAATGATGTTACAGGTGCAGCATTTAACCCAG---
 ATACTGTTGCAGACAGTTTAAACAGCAATTTAGGGCTAGTTAACGTTTATTACGA

AF020078 ACCTAAACAATAATGATGTTACAGATGCAAAAATTTACGCCAG---
 ATACTATTGCAGACAGTTTACAGCAATTTTCAGGACTAGTTAACGTTTATTACGA

AF020079 ACCTAAACAATAATGATGTTACAGATGCAAAAATTTACGCCAG---
 ATACTATTGCAGACAGTTTAAACAGCAATTTTCAGGACTAGTTAACGTTTATTACGA

AF020070 AGCTAAACAATAATGATGTTACAGGTGCAGCATTTAACCCAG---
 ATACTGTTGCAGACAGTTTAAACAGCAATTTAGGGCTAGTTAACGTTTATTACGA

AF020081 ACCTAAACAATAATGATGTTACAGATGCAAAAATTTACGCCAG---
 ATACTATTGCAGACAGTTTAAACAGCAATTTTCAGGACTAGTTAACGTTTATTACGA

AF020073 AGCTAAGCAAG--GATACACTTGATGTAGCTCCTACTCCAG-----
 CAATTGCAGACAGTTTAAACAGCATTTTCAGGATTAGTTAACGTTTATTACGA

AF020072

w2.0

TATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATATGTTGGTGTGGTGTGGTGCAGCGTATATTAGCACACCTTTGGCAACCGC
TGTGAGTAGTCAAAAAT

w3.0

TATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACATTGGTGTGGTGTGGTGCAGCGTATATTAGCACTCCTTTGGAACCGC
TGTGAATGATCAAAAAT

w3.1

TATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACATTGGTGTGGTGTGGTGCAGCGTATATTAGCACTCCTTTGGAACCGC
TGTGAATGATCAAAAAT

w3.2

TATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACATTGGTGTGGTGTGGTGCAGCGTATATTAGCACTCCTTTGGAACCGC
TGTGAATGATCAAAAAT

w3.3

TATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACATTGGTGTGGTGTGGTGCAGCGTATATTAGCACTCCTTTGGAACCGC
TGTGAATGATCAAAAAT

w4.0

TATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACATTGGTGTGGTGTGGTGCAGCGTATATTAGCACACCTTTGGCAATCGC
TGTGAGTAGTCAAAAAT

w4.1

TATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACATTGGTATTGGTGTGGTGCAGCGTATACTAGCACACCTTTGGCAACCGC
TGTGAGTAGTCAAAAAT

w5.0

TATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACATTGGTGTGGTGTGGTGCAGCGTATATTAGCACTCCTTTGGAACCGC
TGTGAATGATCAAAAAT

w6.0

TATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATATGTTGGTGTGGTGTGGTGCAGCGTATATTAGCACACCTTTGGCAACCGC
TGTGAGTAGTCAAAAAT

w7.0

TATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACATTGGTGTGGTGTGGTGCAGCGTATATTAGCACTCCTTTGGAACCGC
TGTGAATGATCAAAAAT

w8.0

TATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATATGTTGGTGTGGTGTGGTGCAGCGTATATTAGCACTCCTTTGAAAGACGC
TGTGAATGATCAAAAAT

w8.1

TATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATATGTTGGTGTGGTGTGGTGCAGCGTATATTAGCACTCCTTTGAAAGACGC
TGTGAATGATCAAAAAT

AF418556

TATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATATGTTGGTGTGGTGTGGTGCAGCGTATATTAGCACACCTTTGGCAACCGC
TGTGAGTAGTCAAAAAT

AF020067

TATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACATTGGTGTGGTGTGGTGCAGCGTATATTAGCACTCCTTTGGAACCGC
TGTGAATGATCAAAAAT

AY620229

TATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACATTGGTGTGGTGTGGTGCAGCGTATATTAGCACTCCTTTGGAACCGC
TGTGAATGATCAAAAAT

AF020075

TATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATATGTTGGTGTGGTGTGGTGCAGCGTATATTAGCACACCTTTGGCAACCGC
TGTGAGTAGTCAAAAAT

AF020068

TATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATATGTTGGTGTGGTGTGGTGCAGCGTATATTAGCACACCTTTGGCAACCGC
TGTGAGTAGTCAAAAAT

AF020077

TATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATATGTTGGTGTGGTGTGGTGCAGCGTATATTAGCACACCTTTGGCAACTGT
TGTGAGTAGTCAAAAAT

AF020071

TATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATATGTTGGTGTGGTGTGGTGCAGCGTATATTAGCACACCTTTGGCAACTGC
TGTGAGTAGTCAAAAAT

AY157680

TATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATATGTTGGTGTGGTGTGGTGCAGCGTATATTAGCACTCCTTTGAAAGACGC
TGTGAATGATCAAAAAT

AF020078

TATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATATATTGGTGTGGTGTGGTGCAGCGTATATTAGCACTCCTTTGAAAGACGC
TGTGAATGATCAAAAAT

AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACCCAGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG

w1.2

AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACCCAGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG

w1.3

AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACCCAGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG

w1.4

AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAGAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACCCAGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG

w1.5

AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACCCAGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG

w1.6

AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACCCAGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGC
TATTCGGTTC TTATG

w1.7

AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACCCAGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG

w1.8

AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACCCAGAAGTCAAACTTTGTGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG

w2.0

GGTAAATTTGCTTTTGCTGGTCAAGCAAGAGCTGGTGTGAGCTATGACATAAACCAGAAATCAAACCTCTACGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTTTG

w3.0

AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACCCAGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG

w3.1

AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACCCAGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG

w3.2

AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACCCAGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG

w3.3

AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACCCAGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG

w4.0

GGTAAATTTGCTTTTGCTGGTCAAGCAAGAGCTGGTGTGAGCTATGACATAAACCAGAAATCAAACCTCTACGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTTTG

w4.1

GGTAAATTTGCTTTTGCTGGTCAAGCAAGAGCTGGTGTGAGCTATGACATAAACCAGAAATCAAACCTCTACGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTTTG

w5.0

AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACCCAGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG

w6.0

GGTAAATTTGCTTTTGCTGGTCAAGCAAGAGCTGGTGTGAGCTATGACATAAACCAGAAATCAAACCTCTACGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTTTG

w7.0

AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGCAAGAGCTGGTGTGAGCTATGACATAAACCAGAAATCAAACCTCTACGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTTTG

w8.0

AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACCCAGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG

w8.1

AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACCCAGAAGTCAAGCTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG

AF418556

GGTAAATTTGCTTTTGCTGGTCAAGCAAGAGCTGGTGTGAGCTATGACATAAACCAGAAATCAAACCTCTACGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTTTG

AF020067

AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACTCCAGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG
AY620229
AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACTCCAGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG
AF020075
GGTAAATTTGCTTTTTGCTGGTCAAGCAAGAGCTGGTGTCAGCTATGACATAAACCAGAAATCAAACCTTACGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG
AF020068
GGTAAATTTGCTTTTTGCTGGTCAAGCAAGAGCTGGTGTCAGCTATGACATAAACCAGAAATCAAACCTTACGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG
AF020077
GGTAAATTTGCTTTTTGCTGGTCAAGTAAAGAGCTGGTGTTAGTTACGATGTAACTCCAGAAGTCAAACTTTACGCTGGAGCTCGC
TATTCGGTTC TTATG
AF020071
GGTAAATTTGCTTTTTGCTGGTCAAGCAAGAGCTGGTGTTAGTTACGATGTAACTCCAGAAGTCAAACTTTACGCTGGAGCTCGC
TATTCGGTTC TTATG
AY157680
AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACTCCAGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG
AF020078
AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGCTATGATGTAACTCCGGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG
AF020079
AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACTCCGGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG
AF020070
AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACTCCAGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG
AF020081
AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACTCCGGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG
AF020073
GGTAAATTTGCTTTTTGCTGGTCAAGCAAGAGCTGGTGTCAGCTATGACATAAACCAGAAATCAAACCTTACGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG
AF020072
AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACTCCAGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG
AF418557
AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACTCCAGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG
AF020082
GGTAAATTTGCTTTTTGCTGGTCAAGCAAGAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACTCCGGAAGTCAAACTTTATGCCGGTGC TCGC
TATTCGGTTC TTATG
AF020058
AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTCAGCTATGATGTAACTCCAGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG
AY330316
GGTAAATTTGCTTTTTGCTGGTCAAGCAAGAGCTGGTGTTAGTTACGATGTAACCCAGAAGTCAAACTTTACGCTGGAGCTCGC
TATTCGGTTC TTATG
AY331986
GGTAAATTTGCTTTTTGCTGGTCAAGCAAGAGCTGGTGTTAGTTACGATGTAACTCCAGAAATCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTCGGCTC TTATG
AY330323
GGTAAATTTGCTTTTTGCTGGTCAAGCATGAGCTGGTGTTAGTTACGATGTAACTCCAGAAGTCAAACTTTACGCTGGAGCTCGT
TATTCGGTTC TTATG
AF472559
GGTAAATTTGCTTTTTGCTGGTCAAGCAAGAGCTGGTGTTAGTTACGATGTAACTCCAGAAGTCAAACTTTACGCTGGAGCTCGC
TATTCGGTTC TTATG
AF243435
AGTAAATTTGGTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACTCCGGAAGTCAAACTTTATGCTGGAGCTCGT
TATTTGGTTC TTATG
AF326978

CAAAGGAGGACATACAGTCCTTTACAGCACTGTTGGTGC
 w8.1 GTGCTAATTTTCGAT -- AAAAGCGGTG -- GTGAG ---- AAAGA -----
 CAAAGGAGGACATACAGTCCTTTACAGCACTGTTGGTGC
 AF418556 GTGCTCATTTTGAT -- AAAGATACTG -- CTGCAGCAAGCAAAGA -----
 CAAGGGGGAACCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGC
 AF020067
 GTGCTAATTTTGTGGAAAAAAACAGATCCTAAAGATTCAACCAGACAGGTTACTGATGCAGGCGCATACAAAGTTCTTTACA
 GCACTGTTGGTGC
 AY620229
 GTGCTAATTTTGTGGAAAAAAACAGATCCTAAAGATTCAACCAGACAGGTTACTGATGCAGGCGCATACAAAGTTCTTTACA
 GCACTGTTGGTGC
 AF020075 GTGCTCATTTTGAT -- AAAGATACTG -- CTGCAGCAAGCAAAGA -----
 CAAGGGGGAACCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGC
 AF020068 GTGCTCATTTTGAT -- AAAGATACTG -- CTGCAGCAAGCAAAGA -----
 CAAGGGGGAACCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGC
 AF020077 GTGCTAACTTTGTAT -- AAA -- ACTG -- ACAAAG ---- ACGG -----
 CAAAGGGGAACCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGC
 AF020071 GTGCTAACTTTGTAT -- AAAA -- CTG -- ACAAAGAC ---- GG -----
 CAAAGGGGAACCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGC
 AY157680 GTGCTCATTTTGAT -- AAAGATACTG -- CTGCAGCAAGCAAAGA -----
 CAAGGGGGAACCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGC
 AF020078 GTGCTCATTTTGATAGAGA -- TGCTG -- CTGCAGG -- CAAAGA -----
 CAAAGGGGAACCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGC
 AF020079 GTGCTCATTTTGATAAAGA -- TGCTG -- CTGCAGG -- CAAAGA -----
 CAAAGGGGAACCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGC
 AF020070 GTGCTCATTTTGAT -- AAAGATACTG -- CTGCAGCAAGCAAAGA -----
 CAAGGGGGAACCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGC
 AF020081 GTGCTCATTTTGATAAAGA -- TGCTG -- CTGCAGG -- CAAAGA -----
 CAAAGGGGAACCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGC
 AF020073 GTGCTCATTTTGAT -- AAAGATACTG -- CTGCAGCAAGCAAAGA -----
 CAAGGGGGAACCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGC
 AF020072
 GTGCTAATTTTGTGGAAAAAAACAGATCCTAAAAATTCAACCGACAGGCTGCTGATGCAGGCGCATACAAAGTTCTTTACA
 GCACTGTTGGTGC
 AF418557
 GTGCTAATTTTGTGGAAAAAAACAGATCCTAAAGATTCAACCAGACAGGTTACTGATGCAGGCGCATACAAAGTTCTTTACA
 GCACTGTTGGTGC
 AF020082 GTGCTAACTTTGTAT -- AAA -- ACTG -- ACAAAG ---- ATGG -----
 CAAAGGGGAACCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGC
 AF020058 GTGCTCACTTTGATAGCGAAACTACTG -- GTGCAGA -- TAACAAAA --
 AAGTAGTTACCAAAGATGCATACAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGC
 AY330316 GTGCTAACTTTGTAT -- AAA -- ACTG -- ACGAAG ---- ACGG -----
 CAAAGGGGAACCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGC
 AY331986 GTGCTAACTTTGGT -- AAGG -- CAA -- CTAAGAC -----
 GATGCCGGAATCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGC
 AY330323 GTGCTCATTTTGAT -- AAAGATGCTG -- CTGCAGGCA -- AAGA -----
 CAAAGGGGAACCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGC
 AF472559 GTGCTAACTTTGTAT -- AAAA -- CTG -- ACAAAGAC -----
 AAAGGGGAACCAAAGTTCTTTACAGCACCCGTTGGTGC
 AF243435 GTGCTAATTTTCGAT -- AAAAGCGGTG -- GTGAG ---- AAAGA -----
 CAAAGGAGGACATACAGTTCCTTTACAGCACTGTTGGTGC
 AF326978 GTGCTAATTTTCGAT -- AGCGATGCTAGTAAAAAAGA -----
 TAAAGGAGGACATGCAGTTTTTACAGCACTGTTGGTGC
 AY596781 GTGCTCATTTTGAT ----- GA -----
 CAAGGGGGAATTCAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGGTGC

X. ANEXOS I e II