

Fernando Kamimura Cocchi

Efeitos da bactéria *Wolbachia* em parâmetros reprodutivos de *Anastrepha* sp.1 *affinis fraterculus* (Diptera: Tephritidae)

Effects of *Wolbachia* bacteria on reproductive parameters of *Anastrepha* sp.1 *affinis fraterculus* (Diptera: Tephritidae)

São Paulo

2021

Fernando Kamimura Cocchi

Efeitos da bactéria *Wolbachia* em parâmetros reprodutivos de *Anastrepha* sp.1 *affinis fraterculus* (Diptera: Tephritidae)

Effects of *Wolbachia* bacteria on reproductive parameters of *Anastrepha* sp.1 *affinis fraterculus* (Diptera: Tephritidae)

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

Orientadora: Profa. Dra. Denise Selivon Scheepmaker

São Paulo

2021

Kamimura Cocchi, Fernando

Efeitos da bactéria Wolbachia em parâmetros reprodutivos de *Anastrepha sp.1 affinis fraterculus* (Diptera: Tephritidae) : Effects of Wolbachia bacteria on reproductive parameters of *Anastrepha sp.1 affinis fraterculus* (Diptera: Tephritidae) / Fernando Kamimura Cocchi ; orientadora Denise Selivon Scheepmaker -- São Paulo, 2021.

53 p.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Evolutiva.

1. Wolbachia pipientis. 2. *Anastrepha sp.1 aff. fraterculus*. 3. Incompatibilidade citoplasmática. 4. Preferência sexual. 5. Hidrocarbonetos cuticulares. I. Selivon Scheepmaker, Denise, orient.
II. Título.

Dedico ao meu avô
Masaharu Kamimura

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Deus pela oportunidade de ter concluído dois dos meus sonhos, concluir um Doutorado e estudar na maior universidade do país, a USP;

À minha família Luiz, Mieko e Rafael por sempre me apoiarem e amarem;

À minha esposa Camila pelo apoio, amor e paciência durante todo o período do doutorado e por trazer ao mundo a luz da minha vida, minha filha Clara;

Aos funcionários da USP Verônica, Rose, Elaine, Capitão, Ana, Rosi que sempre me trataram com respeito e amizade;

Aos estagiários Lucas, Rebecca, Cristiano, Mayra, Marina (Kodak) e Jaqueline que tive o prazer de ensinar e orientar;

Aos colegas de departamento Alessandro Bigoni, Glauco, Stefani, Livia Ataíde, Camila, Rafaella Monteiro, Priscila Santos, Adrian, Raquel e principalmente a Carolina de Athayde Mendonça por me auxiliar e explicar estatística e algumas funções do programa R;

Aos amigos Rodrigo, Marcio, Lucas, Guilherme, Montanha que conquistei na Fatless;

Ao meu grande amigo Leandro e sua família pelas conversas, filmes e cafés;

Ao Junior e sua família Thais e Lucas pela amizade mais longa que tenho;

À Danielle Mansani pela amizade, apoio e pelas tardes de conversa;

À todas as amigas não citadas que conquistei durante este período ou antes dele;

À Ilma. Sra. Regina Célia Mingroni Netto, Presidente da CPG, e à Sra. Erika Harumi Takamoto de Camargo da Secretaria de Pós-Graduação - IB/USP, por me auxiliarem em um momento muito complicado que passei;

À USP, ao Instituto de Biociências e principalmente ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva por ter cedido minha Bolsa de Estudos para que pudesse concluir este doutorado;

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001;

Pelo financiamento via processo nº 2016/00782-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP);

Ao Prof. Dr. Marcelo José Pena Ferreira por me receber em seu laboratório de braços abertos, auxiliar com os experimentos com o GC e por toda gentileza e atenção com minha pessoa;

Ao Prof. Dr. André Luiz Paranhos Perondini por sempre me incentivar, orientar, ensinar, ajudar e principalmente por se preocupar com seus alunos;

À Profa. Dra. Denise Selivon pela orientação e apoio neste projeto, pelos pós almoços com café e muita discussão enriquecedora a respeito das moscas-das-frutas, pelas puxadas de orelha que todo aluno precisa para amadurecer.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	8
2.1 Objetivos específicos	8
3 MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Amostras de moscas-das-frutas	9
3.2 Manutenção das colônias de <i>A. sp.1 aff. fraterculus</i>	9
3.3 Detecção da <i>Wolbachia</i> pela amplificação do fragmento do gene <i>wsp</i>	9
3.3.1 <i>Extração de DNA</i>	9
3.3.2 <i>Detecção e Identificação da <u>Wolbachia</u> pela técnica de PCR e sequenciamento</i>	10
3.3.3 <i>Caracterização da linhagem da <u>Wolbachia</u></i>	11
3.4 Estabelecimento de linhagens isentas (curadas) de <i>Wolbachia</i>	12
3.5 Estimativas de parâmetros de desempenho reprodutivo e Teste de Incompatibilidade Citoplasmática (IC)	14
3.6 Escolha de parceiros	14
3.7 Análises dos hidrocarbonetos cuticulares	15
4 RESULTADOS	17
4.1 Detecção de infecção e identificação da presença de <i>Wolbachia</i>	17
4.1.1 <i>Extração de DNA</i>	17
4.1.2 <i>Amplificação do fragmento de gene <i>wsp</i></i>	17
4.1.3 <i>Caracterização da linhagem da <u>Wolbachia</u></i>	18
4.2 Estabelecimento de linhagens de <i>A. sp1</i> isentas (curadas) de <i>Wolbachia</i>	21
4.2.1 <i>Métodos de tratamento testados</i>	21
4.2.2 <i>Obtenção de linhagem de <i>A. sp1</i> isenta de <i>Wolbachia</i></i>	22
4.3 Parâmetros de desempenho reprodutivo e IC	23
4.4 Testes de escolha de parceiros para acasalamento	26
4.5 Análise dos hidrocarbonetos cuticulares	28
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÕES	27
RESUMO	38
ABSTRACT	39
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

As espécies da família Tephritidae habitam as regiões tropical e subtropical do globo e mostram uma característica comum que é o uso de tecido vegetal como recurso alimentar para o desenvolvimento do estágio imaturo. Existem dois grandes grupos, um em que as espécies se desenvolvem em flores e outro no qual as espécies utilizam frutos para o desenvolvimento das larvas (WHITE; ELSON-HARRIS, 1992). Muitas das espécies frugívoras utilizam como hospedeiros frutos que são cultivados, portanto, de interesse econômico e as espécies de moscas-das-frutas que utilizam estes hospedeiros são consideradas insetos-praga. Os prejuízos anuais à fruticultura mundial é da ordem de bilhões de dólares (RENDÓN; ENKELIN, 2021), ocorrem tanto pela perda direta dos frutos infestados, quanto pela limitação de acesso dos frutos ao mercado internacional devido às restrições impostas por países onde não existem determinadas espécies de moscas-das-frutas (“*fruit-fly-free countries*”) e pelos custos de programas de controle populacional dessas espécies-pragas (ROESSLER, 1989; KOYAMA *et al.*, 2004; VARGAS *et al.*, 2004; EKESI *et al.*, 2009).

As espécies frugívoras de maior importância econômica, na América Latina, pertencem ao gênero *Anastrepha* (região Neotropical); *Bactrocera* (Ásia e Oceania); *Dacus* (África); *Ceratitis* (África e introduzido na Austrália, Ásia, Europa e Américas); e *Rhagoletis* (áreas temperadas da Europa e Américas) (WHITE; ELSON-HARRIS, 1992; RENDÓN; ENKELIN, 2021). No Brasil, as espécies de maior importância pertencem aos gêneros *Anastrepha* e *Ceratitis* (MALAVASI *et al.*, 2000).

O gênero *Anastrepha* é endêmico do continente americano e as 250 espécies descritas estão agrupadas em 22 grupos taxonômicos infragenéricos (NORRBOM *et al.*, 2012). No Brasil, 115 espécies estão presentes, sendo somente sete delas consideradas de importância econômica: *A. fraterculus*, *A. obliqua*, *A. grandis*, *A. zenildae*, *A. sororcula*, *A. striata* e *A. pseudoparallela* (ZUCCHI, 2008).

A espécie nominal *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann), denominada “Mosca-das-frutas Sul-americana”, é considerada uma das espécies mais importantes economicamente na América Latina. Polífaga e com ampla distribuição geográfica, seu *status* de praga varia de acordo com a região de ocorrência e hospedeiro mais comumente utilizado (NASCIMENTO *et al.*, 1992; ALUJA, 1994). Na realidade, *A. fraterculus* (*sensu lato*) engloba um grupo de espécies crípticas que habitam desde o sul dos Estados Unidos, México e América Central, ilhas do Caribe, até a Argentina (WHITE; ELSON-HARRIS, 1992). As primeiras evidências sobre variabilidade morfológica em *A. fraterculus* foram descritas por Stone (1942), em uma

revisão sobre o gênero *Anastrepha*, tendo considerado as variações raças geográficas. No entanto, Baker *et al.* (1944) sugerem, pela primeira vez, que essa variabilidade morfológica poderia indicar a presença de espécies crípticas. Desde então, numerosos estudos deram suporte à hipótese da presença de espécies crípticas, tais como: diferenças no cariótipo (MENDES, 1958; BUSH, 1962; SOLFERINI; MORGANTE, 1987; SELIVON; PERONDINI, 1998); divergências nas isoenzimas (MORGANTE *et al.*, 1980; STECK, 1991; SELIVON, 1996); diferenças nas sequências de DNA mitocondrial (STECK; SHEPPARD, 1993; SANTOS, 1994; SMITH-CALDAS *et al.*, 2001), 16S (MCPHERON *et al.*, 1999) e do gene nuclear *period* (BARR *et al.*, 2005).

No entanto, nesses estudos foram empregadas amostras distintas e foram analisados parâmetros biológicos diferentes o que impediu o reconhecimento dos táxons envolvidos. Este problema foi resolvido, pela primeira vez em moscas-das-frutas, pela análise integrada de várias características morfológicas, genéticas e testes de isolamento reprodutivo aplicadas às mesmas amostras populacionais (SELIVON, 1996; SELIVON *et al.*, 2004, 2005), conceito atualmente conhecido como “taxonomia integrativa”. Desse modo, foram reconhecidas três entidades biológicas dentro do complexo de espécies crípticas de *A. fraterculus* (complexo AF) no Brasil: *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus*, *A. sp.2. aff. fraterculus* e *A. sp.3 aff. fraterculus* (abreviado como *A. sp.1*, *A. sp.2* e *A. sp.3*) (SELIVON *et al.*, 2004, 2005; SELIVON; PERONDINI, 2007).

Análises morfométricas foram estendidas empregando amostras de *A. fraterculus*, coletadas ao longo da Região Neotropical (Brasil, Argentina, Peru, Equador, Colômbia, Venezuela, Guatemala e México) e forneceram evidências de que diferentes morfotipos ocorrem nessas áreas geográficas (HERNÁNDEZ-ORTIZ *et al.*, 2004, 2012, 2015). Esses dados mostraram a existência de oito morfotipos no complexo AF: “Mexicano” (ocorrendo no México, Guatemala e Panamá), “Venezuelano” (terras baixas da Venezuela), “Andino” (montanhas da Venezuela e Colômbia), “Peruano” (planícies costeiras do Peru e Equador), “Equatoriano” (altas altitudes do Peru e Equador) e os três morfotipos brasileiros: “Brasileiro-1” (incluindo amostras da Argentina), “Brasileiro-2” e “Brasileiro-3” (correspondendo a *A. sp.1*, *A. sp.2* e *A. sp.3* caracterizados anteriormente).

Após a caracterização dos morfotipos, os testes de compatibilidade de acasalamento revelaram a existência de barreiras reprodutivas entre vários morfotipos corroborando, assim, a hipótese de que os morfotipos deviam corresponder a espécies biológicas distintas (SELIVON *et al.*, 1999, 2004, 2005; VERA *et al.*, 2006; CÁCERES *et al.*, 2009; SEGURA *et al.*, 2011; RULL *et al.*, 2012, 2013; DEVESCOVI *et al.*, 2014; ABRAHAM *et al.*, 2014;

MANNI *et al.*, 2015; RORIZ *et al.*, 2017). Revisões sobre esses estudos encontram-se em HENDRICHS *et al.* (2015) e VANÍČKOVÁ *et al.* (2015a).

Caracteristicamente, muitas espécies de *Anastrepha*, incluindo as espécies do complexo AF, apresentam um comportamento de cópula bastante elaborado (DÍAZ-FLEISCHER; ALUJA, 1999), incluindo o complexo *fraterculus* (VANÍČKOVÁ *et al.*, 2015a). O comportamento reprodutivo envolve uma série complexa de sinalizações visuais e químicas, incluindo a emissão de feromônios sexuais e o reconhecimento espécie-específico dos hidrocarbonetos cuticulares.

Um outro mecanismo, que pode estar envolvido no isolamento reprodutivo entre as espécies do complexo, é a presença de bactérias endossimbióticas, tais como a *Wolbachia pipientis*, como sugerido previamente por Selivon *et al.* (2005). Linhagens da bactéria *Wolbachia* foram detectadas em espécies de tefritídeos frugívoros, como *Anastrepha suspensa* (WERREN *et al.*, 1995), em várias espécies de *Bactrocera* (KITAYAPONG *et al.*, 2000; JEYAPRAKASHI; HOY, 2000; JAMNONGLUCK *et al.*, 2003; KARIMI; DARSOUVEI, 2014; MORROW *et al.*, 2014, 2015) e em *Rhagoletis cerasi* (RIEGLER; STAUFFER, 2002; ARTHOFER *et al.*, 2009; AUGUSTINOS *et al.*, 2011).

No Brasil, Selivon (1996) observaram que embriões de *A. sp.2 aff. fraterculus* exibiam uma grande população de bactérias espalhadas pelo vitelo e nas células germinativas primordiais. Posteriormente, Selivon *et al.* (2002) demonstraram por PCR e sequenciamento do gene *ftsZ* do ciclo celular bacteriano, que essas bactérias endossimbiontes em *A. sp.2 aff. fraterculus* pertenciam ao gênero *Wolbachia*. A bactéria foi posteriormente descrita em 16 espécies de *Anastrepha* (COSCRATO *et al.*, 2009; MARCON *et al.*, 2011; MARTINEZ *et al.*, 2012; MASCARENHAS *et al.*, 2016) e em amostras do complexo AF ao longo da Região Neotropical (PREZOTTO *et al.*, 2017). As análises ao longo da região Neotropical mostraram a presença de diversas linhagens de *Wolbachia*, sendo algumas comuns aos diferentes morfotipos, por exemplo do Brasil e México, bem como linhagens regionais distintas em diferentes morfotipos. Mostrou, ainda que a taxa de infecção nas espécies encontra-se entre as mais altas (~80%) já descritas para espécies de insetos.

A *Wolbachia* é uma α -proteobactéria intracelular obrigatória da família Rickettsiaceae (WERREN, 1997) e foram observadas pela primeira vez, em tecidos reprodutivos do mosquito *Culex pipiens* (HERTING; WOLBACH, 1924) e, posteriormente identificadas como *Wolbachia pipientis* (HERTING, 1936). Estudos prévios estimaram que 40 a 70% das espécies de insetos estariam infectadas pela *Wolbachia* (JEYAPRAKASHI; HOY, 2000; HILGENBOEKER *et al.*, 2008; BALDO *et al.*, 2010), mas estimativas recentes sugerem que

50% das espécies de insetos e nematódeos estejam infectados pela *Wolbachia* (WEINERT *et al.*, 2015; LEFOULON *et al.*, 2016; SCHOLZ *et al.*, 2020).

O genoma da bactéria *Wolbachia* é pequeno (1,08 a 1,7 Mb) o que está de acordo com o tamanho do genoma de outras bactérias pertencentes ao grupo das Rickettsias (0,8 a 2,1 Mb) e possivelmente a tendência de redução esteja associada às adaptações ao hábito de vida intracelular obrigatório. O genoma da *Wolbachia* contém um conjunto central de genes que é comum a todas as linhagens e outro conjunto de genes acessórios variáveis que está presente em linhagens distintas, com diferentes efeitos fenotípicos nos hospedeiros. Por exemplo, o conjunto *Ankyrin* (ANK) contém repetições de proteínas relacionadas com interações proteína-proteína nas células eucarióticas (DURON *et al.*, 2007) e o grupo pro-fago WO é relacionado com a transferência entre bactérias coinfectantes e com a recombinação intragênica (KENT; BORDESNTTEIN, 2010), além de conter genes acessórios relacionados a incompatibilidade citoplasmática e morte de machos (PERLMUTTE *et al.*, 2019).

Baseando-se no sistema de tipificação por locos múltiplos (MSLT) (BALDO *et al.*, 2006) as linhagens de *Wolbachia* foram agrupadas em 17 possíveis supergrupos filogenéticos, nomeados como A-F, H-Q e S. É relevante notar que a maioria das sequências genômicas da *Wolbachia* são de linhagens dos supergrupos A e B enquanto os demais supergrupos são representados apenas por linhagens únicas. O supergrupo C e D ocorre em nematódeos da filariose, o E em colêmbolas e o F em térmitas, curculionídeos, heterópteros e escorpiões (GLOWSKA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016; LEFOULON *et al.*, 2020). Os supergrupos A e B ocorrem principalmente nos artrópodos e são, em sua maioria, parasitas reprodutivos que manipulam a reprodução dos seus hospedeiros aumentando a chance de sua própria reprodução através da transmissão vertical, via materna (WERREN *et al.*, 2008). Em alguns casos, o parasitismo evoluiu para relações mutualísticas, com a bactéria afetando positivamente vários mecanismos adaptativos de seus hospedeiros (SNOOK *et al.*, 2000; MILLER *et al.*, 2010; SARIDAKI; BOURTZIS, 2010).

A *Wolbachia* infecta células de tecidos somáticos assim como do sistema reprodutivo, nos artrópodos e, também, nos nemátodos (DOBSON *et al.*, 1999; ALBERTSON *et al.*, 2013). Essas bactérias são transmitidas maternalmente de uma fêmea infectada para a prole (transmissão ovariana, ou vertical), mas os machos infectados não transmitem as bactérias, pois durante a espermiogênese as bactérias são eliminadas na maturação dos espermatozoides (CLARK *et al.*, 2002; RIPARBELLI *et al.*, 2007). Esses mecanismos foram observados em *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus* em análises pela microscopia eletrônica de transmissão de células germinativas embrionárias de fêmeas e durante o desenvolvimento dos ovários até o

estágio adulto (SELIVON, 1996) e pela análise citológica da espermiogênese de machos infectados (PREZOTTO, 2012).

Embora a transmissão materna seja predominante estima-se que a transmissão horizontal entre hospedeiros deve ser frequente (WERREN *et al.*, 2008). Já foi demonstrado que a transmissão horizontal ocorre naturalmente e em experimentos de laboratório, via canibalismo, predação de indivíduos infectados, parasitismo, introgressão em híbridos e compartilhamento de nichos ecológicos (HEATH *et al.*, 1999; RAYCHOUDHURY *et al.*, 2009; LE CLECH'H *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2017). Evidências de transmissão horizontal também foram observadas entre espécies de *Anastrepha* (Tephritidae) e micro himenópteros parasitoides (Braconidae) associados no Brasil (MASCARENHAS *et al.*, 2016).

Em artrópodos, a *Wolbachia* assume um papel de parasita reprodutivo induzindo modificações reprodutivas nos seus hospedeiros de várias formas, tais como incompatibilidade citoplasmática (IC), morte de machos, feminização de machos, partenogênese e em mudanças comportamentais na oviposição e no acasalamento (WERREN, 1997; O'NEIL *et al.*, 1997; STOUTHAMER *et al.*, 1999; WEEKS *et al.*, 2002; HARRIS; BRAIG, 2003; TRAM *et al.*, 2003; WERREN *et al.*, 2008).

Nas décadas de 1950 a 1960, foi descrito que em mosquitos do gênero *Culex*, alguns cruzamentos interespecíficos eram incompatíveis e que essa incompatibilidade era causada pela presença de bactérias endossimbiontes (GHELELOVITCH, 1952). Posteriormente, Laven (1951, 1959, 1967) cunha o termo incompatibilidade citoplasmática para a incompatibilidade uni e bidirecional nos cruzamentos de *Culex*; e Yen e Barr (1971) eliminando as bactérias por tratamento dos hospedeiros com antibióticos, demonstraram que os cruzamentos não eram mais inférteis relacionando, assim, a *Wolbachia* com a IC. Estudos posteriores demonstraram que a *Wolbachia* é responsável pela incompatibilidade reprodutiva em várias espécies, nas quais estes endossimbiontes foram eliminados por tratamentos térmicos (WERREN, 1997; BOURTIZ; O'NEILL, 1998) ou pela ação de antibióticos (BREEUWER; WERREN, 1993; HARIRI *et al.*, 1998; JIGGINS *et al.*, 2001). A indução de IC também foi demonstrada em espécies livres da infecção, pela transferência experimental da *Wolbachia* (BOYLE *et al.*, 1993; BRAIG *et al.*, 1994; ZABALOU *et al.*, 2004).

Incompatibilidade citoplasmática (IC) é o fenótipo mais comum induzido por *Wolbachia* e ocorre quando machos infectados cruzam com fêmeas não infectadas, a denominada IC unidirecional. Pode ocorrer, também, quando machos e fêmeas são infectados por linhagens distintas e incompatíveis da *Wolbachia* e nesses casos todos os cruzamentos são

inviáveis (IC bidirecional) (BOURTZIS *et al.*, 2003; WERREN *et al.*, 2008). Em *D. melanogaster* demonstrou-se que a IC ocorre por falha na sincronização entre os pró-núcleos masculino e feminino, no início da primeira mitose do embrião, resultando em alterações na segregação dos cromossomos e causando um impedimento no desenvolvimento inicial do embrião (LASSY; KARR, 1996). A infecção pela *Wolbachia* não assegura que a IC seja induzida, pois está demonstrado que a habilidade da *Wolbachia* em induzir a IC depende de ambos, o hospedeiro e da linhagem da bactéria (POINSOT *et al.*, 1998; BOURTZIS *et al.*, 2003; CLARK *et al.*, 2003).

Nas moscas-das-frutas a IC foi descrita e estudada em *Rhagoletis cerasi* (RIEGLER; STAUFER, 2002; ARTHOFER *et al.*, 2009; AUGUSTINOS *et al.*, 2011), enquanto em *Bactrocera oleae* (APOSTOLAKAI *et al.*, 2011) e *Ceratitis capitata* (ZABALOU *et al.*, 2004) a IC foi induzida por transfecção da *Wolbachia* vinda de *R. cerasi*. Evidências preliminares da existência de IC foram obtidas em *A. sp.1 aff. fraterculus* e *Anastrepha obliqua* (RIBEIRO, 2009) em exemplares coletados no Brasil. Recentemente, duas linhagens de *Wolbachia*, wAfraCast1 e wAfraCast2, foram detectadas em *A. sp.1 aff. fraterculus* na Argentina. Os resultados de cruzamentos sugeriram que a linhagem wAfraCast1 poderia estar induzindo a morte de machos (CONTE *et al.*, 2019). Em outro estudo, IC intraespecífica (unidirecional) foi demonstrada em *A. sp.1 aff. fraterculus* infestada com a linhagem wAfraCast2-A e em exemplares do morfotipo Peruano, portando uma linhagem distinta (alelo 23 do gene *wsp*). Demonstrou-se também a inexistência de IC bidirecional entre as linhagens da Argentina e Peruana (DEVESCOVI *et al.*, 2019).

As modificações causadas pela *Wolbachia* afetam também a produção de feromônios e de hidrocarbonetos que são depositados na superfície cuticular do corpo. Estudando as possíveis alterações causadas pela bactéria em *Drosophila*; Pontier e Schweisguth (2015) verificaram que a produção de hormônios e hidrocarbonetos cuticulares relacionados à comunicação entre machos e fêmeas é alterada pela *Wolbachia*, indicando a existência de outra forma de incompatibilidade reprodutiva.

As alterações reprodutivas causadas pela *Wolbachia*, principalmente a IC, é considerada um mecanismo possível a ser utilizado no controle biológico de insetos praga ou vetores de doenças, a chamada Técnica do Inseto Incompatível (TII) (ZABALOU *et al.*, 2004, 2009; BRELSFOARD; DOBSON, 2009; APOSTOLAKI *et al.*, 2011; ATYAME *et al.*, 2011; WALKER *et al.*, 2011; GURUPRASAD *et al.*, 2011). Entretanto, como muitas espécies de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha*, assim como a *A. sp.1 aff. fraterculus*, exibem um complexo ritual de corte e cópula (SELIVON *et al.*, 2005; DIAS *et al.*, 2016; VANÍČKOVÁ

et al., 2015a; RORIZ *et al.*, 2017), é necessário investigar se a infecção por *Wolbachia* induz alterações significativas no comportamento reprodutivo dessa espécie, compatíveis com o emprego da metodologia TII no controle populacional desse inseto praga.

2 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho propõe investigar os efeitos reprodutivos em uma amostra populacional de *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus* relacionados à infecção pela bactéria *Wolbachia pipientis*.

2.1 Objetivos específicos

- Identificar a linhagem de *Wolbachia* presente na colônia de *A. sp.1 aff. fraterculus* (W+);
- Testar os métodos de tratamento por calor e por antibiótico no estabelecimento de amostras da colônia de *A. sp.1 aff. fraterculus* isentas de *Wolbachia* (W-);
- Determinar a concentração mínima de antibiótico necessária para eliminar a população de *Wolbachia* em amostras da colônia de *A. sp.1 aff. fraterculus*;
- Estimar se a presença de *Wolbachia* afeta parâmetros de desempenho reprodutivo do hospedeiro *A. sp.1 aff. fraterculus*;
- Verificar se a linhagem de *Wolbachia* identificada na colônia de *A. sp.1 aff. fraterculus* é promotora de IC;
- Verificar se a linhagem de *Wolbachia* identificada na colônia de *A. sp.1 aff. fraterculus* interfere na escolha de parceiros sexuais entre indivíduos infectados (W+) e curados (W-);
- Verificar se a linhagem de *Wolbachia* identificada altera a composição dos hidrocarbonetos cuticulares do hospedeiro *A. sp.1 aff. fraterculus*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostra das moscas-das-frutas

O presente estudo foi realizado com uma colônia de *A. sp.1 affinis fraterculus* mantida no laboratório há cerca de 30 gerações, infectada naturalmente por *Wolbachia*. A colônia foi estabelecida a partir de uma amostra populacional de *Anastrepha sp.1 aff. fraterculus* (Diptera, Tephritidae), originária de exemplares coletados em goiaba (*Psidium guajaba*), provenientes do Vale do Rio Paraíba do Sul (SP).

3.2 Manutenção da colônia de *A. sp.1 aff. fraterculus*

A colônia foi mantida em gaiolas de manutenção dos insetos de 30x30x40 cm, em sala com controle de temperatura a 25 °C, umidade relativa de 70±5%, foto período natural e dieta preparada com os seguintes ingredientes: 10 mL de mel, 30 mL de hidrolisado de proteína de milho, 0,5 g de Levemil[®], 6 g de levedo de cerveja, 0,5 g de Sustagem[®], 25 g de açúcar mascavo e 45 g de açúcar branco. A água foi fornecida através de uma tira de esponja de celulose (Chamex[®]) que permaneceu constantemente embebida por ficar inserida em um recipiente com água. Para a oviposição e desenvolvimento larval foram fornecidos semanalmente mamões (*Carica papaya*) os quais foram transferidos, após uma semana de exposição aos insetos adultos, para recipientes com vermiculita onde permaneceram até a obtenção de pupas. Estas foram transferidas para as caixas de população onde emergiram os adultos (SELIVON, 1996).

3.3 Detecção da *Wolbachia* pela amplificação do fragmento do gene *wsp*

3.3.1 Extração de DNA

O DNA total foi extraído segundo protocolo adaptado de Jowett (1986). Os indivíduos adultos foram colocados individualmente em microtubos de polipropileno de 1,5 mL contendo 100 µL de TNES [250 mM Tris (pH 7,5); 2 M NaCl; 100 mM EDTA; 2,5% SDS] e macerados. Após esta etapa, em cada microtubo foi acrescentado 100 µL de TNES e 2,0 µL de Proteinase K (20 mg/mL), incubando-os por 30 minutos, a 65 °C. Foram resfriados e então foi adicionado 1 µL RNase (10 mg/mL) (Ribonuclease A, SIGMA) e incubados por 10

minutos a 37 °C. Foi adicionado 100 µL NaCl 5M e as amostras foram agitadas no vórtex por 10 segundos. Foram centrifugados por 7 minutos a 15000 G, a 4 °C. De cada amostra centrifugada foram coletados 200 µL do sobrenadante e transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, onde ocorreu a precipitação do DNA com 200 µL de isopropanol absoluto, seguido de 7 minutos de centrifugação a 15000 G, a 4 °C. Foi retirado todo o sobrenadante e adicionado 200 µL de etanol 70%, seguido de 7 minutos de centrifugação a 15000 G, a 4 °C. Por fim, o precipitado foi seco em estufa a 37 °C por 15 minutos e ressuscitado com 30 µL de TE [10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA], sendo armazenado a -20 °C.

Para examinar se ocorreu a degradação do DNA, amostras foram analisadas por eletroforese com gel de agarose a 1% em tampão TAE 1x (TAE 50x: 242 g de Tris, 100 mL de Ácido Acético 0,5 mM, 100 mL de EDTA 0,5 M pH 8 e água destilada suficiente para completar 1 L) em cubas horizontais com solução tampão de corrida TAE sob corrente elétrica alternada, com tensão de 0,6 A e 5 V/cm de gel. O gel foi corado com GelRed™ (UNISCIENCE), visualizado em um transiluminador UV com filtro vermelho.

3.3.2 Detecção e identificação da *Wolbachia* pela técnica de PCR e sequenciamento

Para atestar a presença de *Wolbachia*, foram feitas reações de PCR utilizando-se os iniciadores específicos para o gene *wsp* da *Wolbachia* (ZHOU *et al.*, 1998):

- *wsp* 81F (5´TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC3´);
- *wsp* 691R (5´AAAAATTAAACGCTACTCCA3´).

Nos casos negativos, com o intuito de testar a qualidade do DNA, as mesmas amostras foram testadas para amplificação de uma porção do gene ribossômico eucariótico 28S, utilizando-se os iniciadores:

- 28SF3633 (5´TACCGTGAGGGAAAGTTGAAA3´);
- 28SR4076 (5´AGACTCCTTGGTCCGTGTTTT3´).

Caso essa amplificação também fosse negativa, eram testadas outras concentrações de DNA para amplificação, conforme descrito por Werren *et al.* (1995). Caso fosse necessário, novas extrações de DNA seriam feitas para que fosse excluída a possibilidade de que a ausência de fragmentos amplificados fosse devido a degradação do DNA. As reações de PCR

tiveram volume final de 20 μL com as seguintes proporções: 13,3 μL de H_2O , 2 μL de Tampão de Reação 10x (BIOTOOLS), 1,2 μL de MgCl_2 , 1,2 μL de dNTPs (10 mM), 0,4 μL de cada iniciador (10 μM) e 0,5 unidades de Polimerase de DNA (Taq) (BIOTOOLS) e 1 μL de amostra de DNA. Para as amplificações o seguinte protocolo foi empregado: 94 °C por 2 min., seguido por 35 ciclos de 94 °C por 1 min., 55 °C por 1 min.; finalizando com 72 °C por 10 min. Para a amplificação do gene 28S rDNA eucariótico a configuração: 94 °C por 2 min., 38 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 50 seg. e 72 °C por 1,5 min.; finalizando com 72 °C por 10 min. (WERREN; WINDSOR, 2000).

Para determinar a presença e o tamanho do fragmento amplificado, uma alíquota de cada amostra foi analisada em Eletroforese Unidimensional, com gel de agarose a 1% em tampão TAE 1x (TAE 50x: 242 g de Tris, 100 mL de Ácido Acético 0,5 mM, 100 mL de EDTA 0,5 M pH 8 e água destilada suficiente para completar 1 L). A eletroforese foi realizada em cubas horizontais com solução tampão de corrida TAE sob corrente elétrica alternada, com tensão de 0,6 A e 5 V/cm de gel. O gel foi corado com GelRed™ (UNISCIENCE), visualizado em um transiluminador UV com filtro vermelho. As imagens dos géis foram digitalizadas em uma câmera digital (VIBER LOUMART) e transferidas para o computador, onde foram feitas as análises.

O sequenciamento foi feito utilizando o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (THERMO FISHER SCIENTIFIC) e as reações com as seguintes proporções: 5 μL de Buffer, 1 μL BigDye, 1 μL de iniciador 20 μM (81F ou 691R) e 2 μL de amostra de DNA (amplificado do PCR). Os fragmentos de *wsp* amplificados foram purificados seguindo o protocolo Perfect Gel Cleanup® (EPPENDORF, Hamburg, Alemanha) e sequenciados em sequenciador ABI 3730 DNA ANALISER (APPLIED BIOSYSTEMS).

As sequências obtidas foram analisadas empregando o Bioedit® e as sequências consenso comparadas com as sequências de *Wolbachia* depositadas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

3.3.3 Caracterização da linhagem da *Wolbachia*

A caracterização da linhagem da *Wolbachia* foi feita através do sequenciamento dos cinco genes pertencentes ao MLST (do inglês, *Multilocus Sequence Typing*): *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *fbpA* e *ftsZ* (BALDO *et al.*, 2006; PARASKEVOPOULOS *et al.*, 2006) utilizando os seguintes iniciadores:

- *gatB*:
 - F1 (5'-GAK TTA AAY CGY GCA GGB GTT-3');
 - R1(5'-TGG YAA YTC RGG YAA AGA TGA-3').

- *coxA*:
 - F1 (5'-TTG GRG CRA TYA ACT TTA TAG-3');
 - R1 (5'- CT AAA GAC TTT KAC RCC AGT-3').

- *hcpA*:
 - F1 (5'-GAA ATA RCA GTT GCT GCA AA-3');
 - R1 (5'- GAA AGT YRA GCA AGY TCT G-3').

- *ftsZ*:
 - F1 (5'-ATY ATG GAR CAT ATA AAR GAT AG-3');
 - R1 (5'-TCR AGY AAT GGA TTR GAT AT-3').

- *fbpA*:
 - F1 (5'-GCT GCT CCR CTT GGY WTG AT-3');
 - R1 (5'-CCR CCA GAR AAA AYY ACT ATT C-3').

O ciclo de amplificação utilizado foi: 2 minutos a 94 °C, 37 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 45 seg. a 54 °C para *hcpA*, *gatB*, *ftsZ* e *coxA*, e 59 °C para *fbpA*, 1 min. e 30 seg. a 72 °C, finalizando com 10 minutos a 72 °C.

As sequências obtidas foram analisadas pelo Bioedit® e as sequências consenso comparadas com as sequências depositadas no banco de dados do PubMLST (*Public databases for molecular typing and microbial genome diversity*) a fim de se obter a identificação da cepa da *Wolbachia*.

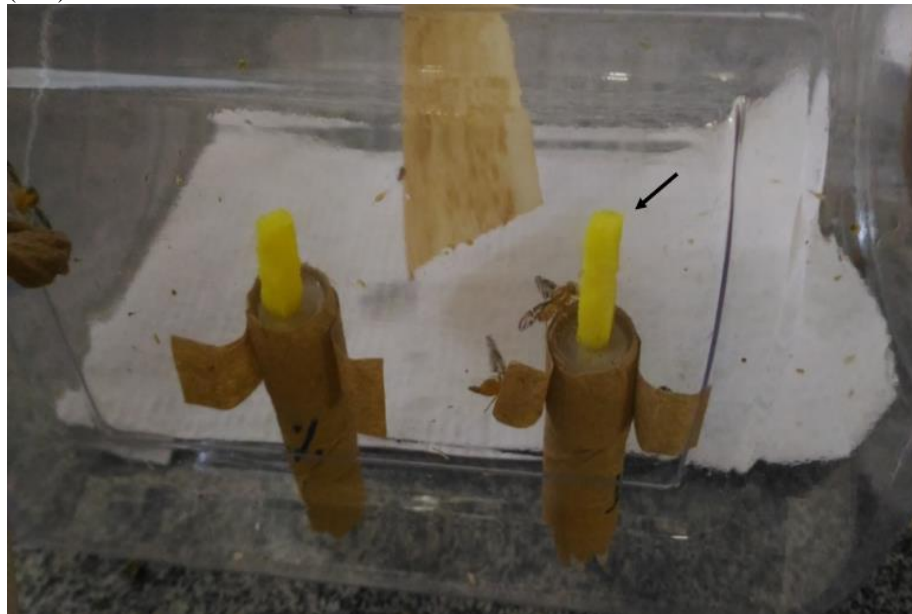
3.4 Estabelecimento de colônias isentas (curadas) de *Wolbachia*

Dois métodos para eliminar as bactérias em *A. sp.1* da colônia original foram testados (HOFFMANN *et al.*, 1986):

1) Tratamento térmico de pupas coletadas logo após a ecdise pupal e mantidas até a emergência dos adultos sob temperatura de 30 °C. Para tanto, amostras de 50 pupas, provenientes da colônia controle, cujas moscas estavam infectadas pela *Wolbachia*, foram colocadas em uma caixa de plástico contendo vermiculita e transferidas para estufa cuja temperatura fora previamente fixada em 30 °C, tendo sido tomado cuidado para evitar a desidratação;

2) Tratamento por administração de solução aquosa de tetraciclina em quatro concentrações: 0,1%, 0,5%, 1,0% e 2,0% (m/v) aplicada às moscas adultas. Para cada tratamento foram separados 10 casais, recém emergidos, e a solução foi fornecida através de uma tira de esponja de celulose (Chamex[®]) que permaneceu constantemente embebida na solução de tetraciclina em um frasco. Esses frascos eram envolvidos com fita adesiva opaca para evitar a degradação do antibiótico pela luz (Figura 1). A solução com o antibiótico foi trocada a cada dois dias, pelo período de uma semana.

Figura 1: Frascos que continham a solução aquosa de tetraciclina administrada às moscas através de uma tira de esponja Chamex[®] (seta).



Fonte: Elaborado pelo autor

A eliminação da *Wolbachia* nos indivíduos tratados foi avaliada pela amplificação ou não do fragmento do gene *wsp* da bactéria (descrito no item 3.3). Com os indivíduos isentos de infecção (curados) foram estabelecidas linhagens de *A. sp.1 aff. fraterculus* (W-) que foram empregadas nos experimentos propostos no projeto.

3.5 Estimativas de parâmetros de desempenho reprodutivo e teste de incompatibilidade citoplasmática (IC)

A fim de se evitar interferência dos tratamentos térmico e por antibiótico nos resultados, como já foi demonstrado em *Drosophila* (SNOOK *et al.*, 2000) foram utilizadas moscas somente a partir da quarta geração das colônias de moscas curadas (W-), para realização dos cruzamentos. Para estes testes foram efetuados quatro tipos de cruzamentos envolvendo espécimes infectados e curados: i) cruzamento entre machos e fêmeas infectados; ii) entre machos infectados e fêmeas não-infectadas; iii) entre machos não-infectados e fêmeas infectadas; iv) entre machos e fêmeas não-infectados. Para cada tipo de cruzamento, dez casais de moscas virgens e sexualmente maduras (15 a 20 dias após a emergência) foram colocados em caixas de população (15x15x20 cm), as quais foram mantidas sob as condições descritas no item 3.2. Foram feitas cinco réplicas de cada tipo de cruzamento.

Foram estimados, em cada cruzamento, parâmetros de desempenho reprodutivo das fêmeas de acordo com os métodos descritos em Selivon *et al.* (2005). Para essas análises foram feitas seis amostragens sendo os ovos coletados entre dois a três dias por, aproximadamente, duas semanas. O número de ovos coletados foi registrado, transferidos para placas de Petri com uma camada de ágar 1%, onde foram mantidos até a eclosão das larvas. O número de larvas eclodidas, a partir de um número conhecido de ovos, foi considerada a taxa de eclosão (ou fertilidade das fêmeas).

Os cruzamentos recíprocos entre indivíduos infectados e curados permitiram também, estimativas da incompatibilidade citoplasmática (IC). O grau de IC foi calculado de acordo com Poinot *et al.* (1998) pela fórmula:

$$\%IC_{\text{corr}} = [(IC_{\text{obs}} - MCC)/(100 - MCC)] \times 100$$

Onde IC_{obs} é a porcentagem de ovos não eclodidos observados nos cruzamentos não-compatíveis, ♀ (W-) x ♂ (W+); MCC é a mortalidade nos cruzamentos compatíveis, ♀ (W+) x ♂ (W-).

3.6 Escolha de parceiros

Para estes testes, machos e fêmeas obtidos das colônias infectadas (W+) e não-infectadas (W-) foram isolados até a maturidade sexual (15 a 20 dias) e posteriormente confrontadas com machos virgens infectados e não-infectados. Foram feitos dois tipos de experimentos: i) 5 fêmeas infectadas juntamente com 5 machos infectados e 5 machos não

infectados*; ii) 5 fêmeas não infectadas juntamente com 5 machos não infectados e 5 machos infectados*. Os machos (*) foram marcados no mesonoto com tinta atóxica branca. Para início dos experimentos, à tarde do dia anterior, os adultos foram colocados em caixas retangulares de vidro (10x10x20 cm), contendo água e alimento. Foram feitas cinco réplicas de cada experimento. As condições ambientais dos testes estão descritas no item **3.2** deste projeto. As observações foram feitas das 06:00 horas até as 12:00 horas, que é o período de atividade reprodutiva de *A. sp.1 aff. fraterculus* (RORIZ *et al.*, 2017), tendo sido registrados, tanto as tentativas quanto o número de cópulas efetivas entre os indivíduos. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa Statistica (STATSOFT Inc).

3.7 Análises dos hidrocarbonetos cuticulares

A fim de obter o lavado do tegumento das moscas, três indivíduos da colônia W- e três da colônia W+ foram mergulhados em um tubo pré-preparado, contendo 300 µL Hexano 95% de pureza (TEDIA) por 3 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, os insetos foram removidos e em seguida foi realizada injeção da solução no CG-EM (Cromatógrafo a Gás acoplado com Espectrômetro de Massas) (adaptado de ESTEVES, 2014). Foram feitas três réplicas para cada amostra, (W-) e (W+).

As análises em cromatografia a gás (CG) foram feitas em um equipamento Agilent CG 6850 acoplado a um espectrômetro de massas (EM) Agilent 5975C (VL MSD) contendo coluna HP-5MS de comprimento 30 m x 0,25 mm e espessura do filme de 0,25 µm. O método utilizado empregou temperatura inicial do forno de 100 °C, mantida por 5 minutos, e taxa de aquecimento de 5 °C.min⁻¹ até atingir a temperatura de 320 °C a qual foi mantida ao final do aquecimento por mais 8 min, totalizando 57 min de análise. As temperaturas do injetor, do quadrupolo e da fonte de íons foram, respectivamente, 300 °C, 180 °C e 280 °C. O volume de injeção da amostra foi de 1 µL empregando Hélio como gás de arraste a 1 mL.min⁻¹. A ionização no EM ocorreu por impacto de elétrons a 70 eV, e a detecção ocorreu em modo de aquisição *full-scan* na faixa de 50-600 m/z a 2,66 scan.s⁻¹. Os n-alcenos foram caracterizados com base nos tempos de retenção dos componentes de uma série homóloga (C19–C40) comercializada pela Sigma-Aldrich.

Os cromatogramas das três réplicas de cada amostra foram comparados a fim de se determinar a média do tempo de retenção de cada composto, sendo selecionados somente aqueles que estivessem presentes em todas as réplicas. As duas amostras tiveram seus padrões (“*finger print*”) comparados para possível identificação de hidrocarbonetos característicos de

cada amostra e a diferença de concentração de cada um deles. Essas análises foram conduzidas no Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Biociências, USP, chefiado pelo Prof. Dr. Marcelo José Pena Ferreira.

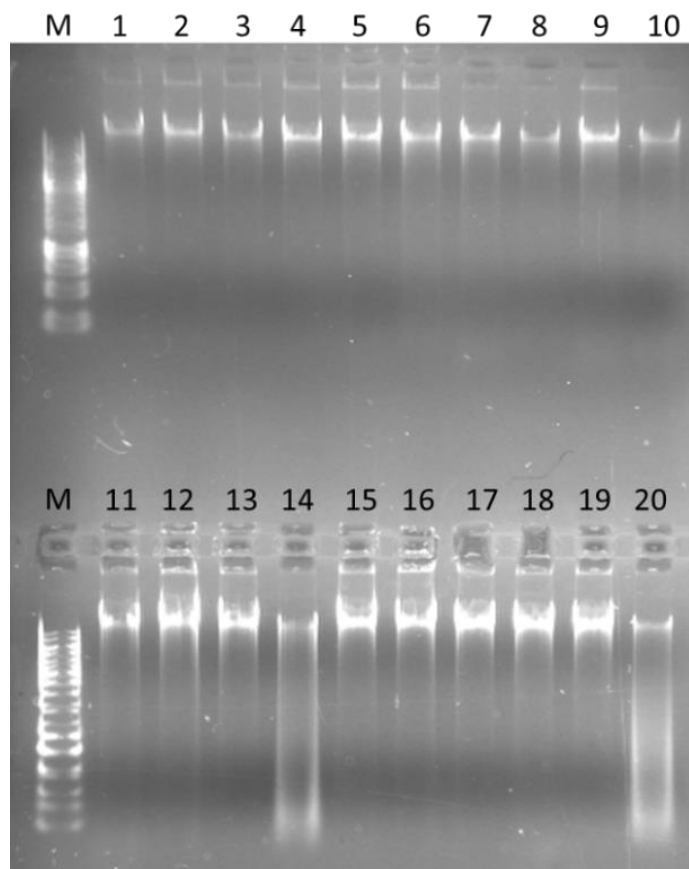
4 RESULTADOS

4.1 Detecção de infecção e identificação da presença de *Wolbachia*

4.1.1 Extração de DNA

A detecção da presença de *Wolbachia* em indivíduos da colônia de *A. sp.1* foi feita pela amplificação do gene *wsp*. Para tanto, extraiu-se o DNA de 20 espécimes da colônia. Como mostra a Figura 2, foi observado que a qualidade do DNA estava preservada, apenas com pequena degradação nas amostras 14 e 20, porém ainda íntegro o suficiente para realizar a próxima etapa.

Figura 2: Eletroforese de amostras de DNA de *A. sp.1* analisadas (1 a 20). M) Marcador molecular com 1 kpb.

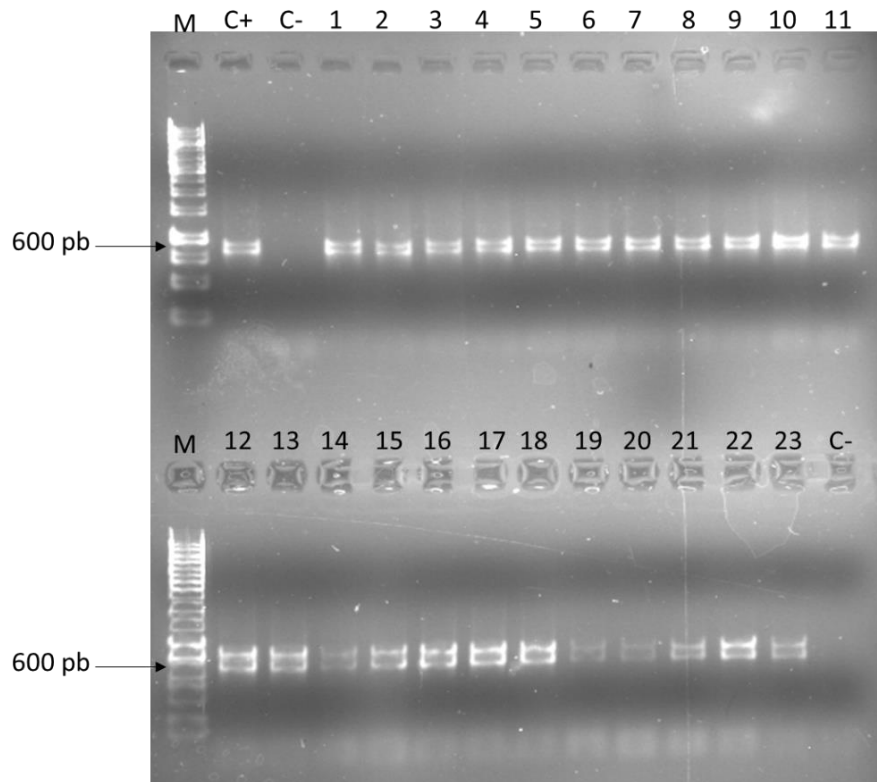


Fonte: Elaborado pelo autor

4.1.2 Amplificação do fragmento de gene *wsp*

A fim de se confirmar a infecção por *Wolbachia*, foram feitas amplificações do fragmento do gene *wsp* através da técnica de PCR (Fig. 3). A análise mostrou que todos os 23 espécimes estavam infectados pela bactéria.

Figura 3: Eletroforese de fragmentos de aproximadamente 600 pb, que corresponde ao tamanho esperado para o gene *wsp*; M) Marcador molecular com 1 kpb; C+) Controle positivo; C-) Controle negativo.



Fonte: Elaborado pelo autor

4.1.3 Caracterização da linhagem da *Wolbachia*

A caracterização da linhagem da *Wolbachia* foi feita pela amplificação e sequenciamento dos cinco genes que compõem o MLST (*gatB*, *coxA*, *hcpA*, *fbpA* e *ftsZ*) (BALDO *et al.*, 2006). As seqüências consenso obtidas foram:

- *gatB*:

```
CGTGCAGGTGTTGCTTTAATGGAAATTGTTTCAGAACCAGATCTCCGTTTCATCTGCGGAAGCTG
CAGAATGCATGAAAAATTGAGGCAGATTTGCGTTACATTGGTTTCGTGTGATGGTGATATGGAAAAGGG
```

ATCACTTCGTTGTGATGCAAATGTTTCTGTCCGCCTAAAAGGCAGTAGTACATTTGGCACTCGTTGTGA
 AATAAAAAATCTGAACTCGATACGTTATATTGTGCAAGCTATAGACTATGAAATTACAAAGACACAAA
 ATTGAAATTTTAGAAAAGTGGAGTAAGAAATAAGTCAAGAGTATACCTTATTGTTTGACGTTGCTTCGG
 GAAAAACAAAAGTGACTGAGAAGCAAATGAGGATGCAAGCGATTATAGATACTTCCCTGAGCCTGATT
 TATTACCTGTTGAGGTAAGCCAGGATAAAATTGATTTAATTCAATCATCTTT;

• *coxA*:

ATGTCATTAACATAAGATGCCACTGTTTGTGTTGGTCTGTCTTGCTAACAGCATTMYGTTGATTG
 TTGCCTTACCAGTGCTTGCCGGTGCTATAACTATGCTTCTTACTGATCGCAATATTGGTACTTCCTTTTTT
 GATCCTGCCGGTGGCGGCGATCCTGTGTTATTTCAACATCTATTTTGGTTTTTTGGTCATCCAGAAGTTT
 ACGTAATTATTTTCTGCATTTGGCATCATAAGTCAGGTTGTATCAACTTTTTCTCACAGACCTGTATT
 TGGTTACATAGGGATGGTTTATGCAATGATAGGTATAGCAGTATTTGGCTTTATGGTTTGGGCTCACCA
 TATGTTCACTGTTGGGCTTAGTGCTGACGCTGCTGCATTTTTTAGCACTACCACAATTTTTATCGGTGTT
 ATAACTGGCGTC;

• *hcpA*:

TGGCAAATCTACCAAAGATAAAAATAGAAACAGCAATAAAAAATGCAACTGGTAACGTTGCT
 GGAGAAAATTACGAGGAAATCCAATATGAAGGTCATGGGCCTTCTGGCACTGCACTCATTGTCCATGT
 TTTGACTAATAATCGCAACCGAAGTCTTCTGAGGTACGTTATATTTTTCTCGCAAGGGTGGAAACTT
 GGGAGAAACAGGAAGTGTTAGTTACCTTTTCGATCATGTAGGCTTAATCGTCTATAAAGCAGAGGGTG
 TGAATTTTGATGATTTATTAGTCATGGAATCGAATTAGAAGTATTGAATGTTGAGGAAAATGACAAA
 GAAGGATTACATCGTTATAACTGTGTGAA;

• *ftsZ*:

AATAAARGATAGTCATATGCTTTTCATCACAGCAGGAATGGGCGGTGGTACTGGAACCGGTGC
 AGCACCGGTAATTGCAAAAGCAGCCAGAGAAGCAAGAGCCGCAGTTAAGGATAGAGCGCCAAAAGAA
 AAAAAGATATTGACTGTTGGAGTTGTAATAAACCCTTCGGTTTTGAAGGTGTGCGCCGTATGCGCATT
 GCAGAGCTTGGACTTGAAGAACTGCAAAAATACGTGGATACACTTATTGTCATTCCAAATCAGAATTT
 ATTTAGAATTGCAAATGAAAAACATTTTCTGATGCATTTAAACTTGCTGATAATGTTCTGCACATTGGC
 ATCAGAGGAGTAACTGACTTGATGGTCATGCCAGGGTTATCAATCTTGACTTCGCTGATATAGAAACA
 GTAATGAGCGAGATGGGCAAAGCGATCCGATCGGCACCGGAGAGGCAGAAG;

• *fbpA*:

GCTCTACTTTTGATGAAGTTTCTATATTTTCTGTTTCCATTCTCTCCCCTTACCACAGATCGTTG
 GAAGCCTCTTCTTGATTATATGCGCTGCAAGCAAAGATGCCAGCTGATGCGGATTTACTATATATCCT
 AACTCTGCGTAAGCACCTTCTTTGGATGGAGGAAGCCGGGGGAATCAGACCTTAGGCCTACTGCAGG

GCCTTGGAGTTGGGTTCTGGTCTTATCCCCGGGCTTCCGCATTTCCAAAGAAGCAGTTAGCGCAACCG
GGGTTTTTGGCAAATCCGACAGCATGGCATCCTAGACGCAGCCTAATATTAATAAGGAGGACATCGC
ATGAACTAAGTGGAAAGCCAGTGAATGGAAACAGATGAAACTGTAACGTTATCAAATAGATGGGAGC
ATTCCAGCAGGAGTTGCAGCGCCGGCATCAGTCTAGCCATG.

As seqüências de cada um dos 5 genes foram comparadas com as depositadas no banco de dados do PubMLST (*Public databases for molecular typing and microbial genome diversity*), tendo sido encontrados os alelos 1, 1, 215, 255 e 437, respectivamente para os genes *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *ftsZ* e *fbpA*. No banco de dados não foi encontrada linhagem de *Wolbachia* com 100% de similaridade com a linhagem ora observada em *A. sp1*. O perfil de alelos mostrou similaridade com a linhagem ST-336, descrita anteriormente para *Wolbachia* infectando *Anastrepha fraterculus* sp.1 do México, a *Afra_A_wMx2* (PREZOTTO *et al.*, 2017) (Fig. 4).

Figura 4: Resultado da comparação do perfil alélico dos cinco genes sequenciados no banco de dados PubMLST.

Please enter your allelic profile below. Blank loci will be ignored. Autofill profile

gatB	coxA	hcpA	ftsZ	fbpA
001	001	215	255	437

ST:

Options: Search: 1 or more matches

Display/sort options: Order by: ST ascending, Display: 25 records per page

Action:

1 record returned. Click the hyperlink for detailed information.

Profile information for ST-336 (MLST)

ST	gatB	coxA	hcpA	ftsZ	fbpA	clonal complex
336	201	1	215	164	1	

sender: Leandro Prezotto, Institute of Biosciences (IB), University of Sao Paulo (USP)
 curator: Amanda Avery, University of Rochester, Dept. of Biology
 date entered: 2012-10-11
 datestamp: 2012-10-11

Isolate fields								MLST					WSP						
id	strain	aliases	supergroup	host genus	host species	country	sender	gatB	coxA	hcpA	ftsZ	fbpA	ST	clonal complex	wsp	HVR1	HVR2	HVR3	HVR4
1798	Afra_A_wMx2		A	Anastrepha	A. fraterculus s.l.	Mexico	Leandro Prezotto	201	1	215	164	1	336		651	1	12	257	283

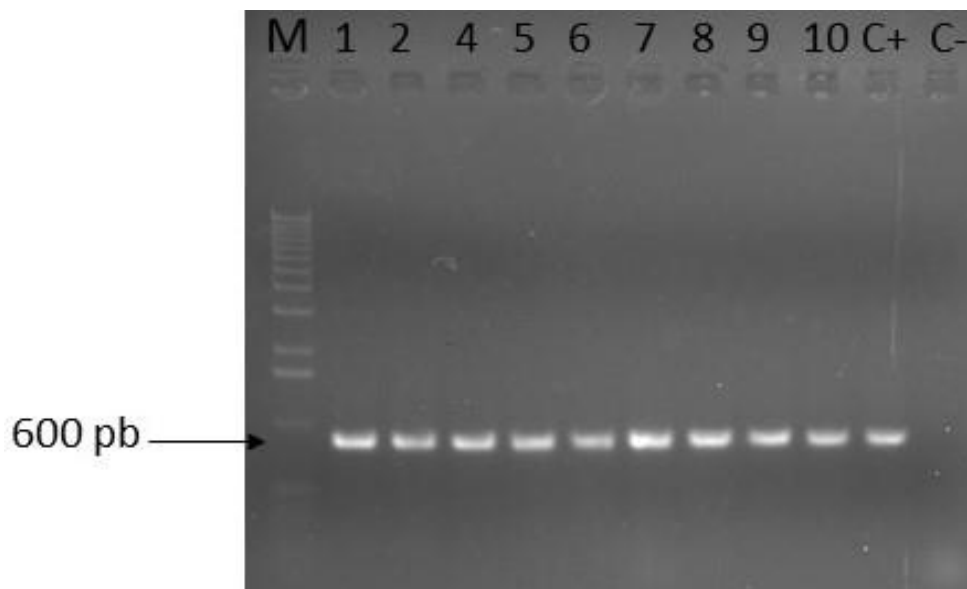
Fonte: Elaborado pelo autor

4.2 Estabelecimento de linhagens de *A. sp1* isentas (curadas) de *Wolbachia*

4.2.1 Métodos de tratamento testados

Foram testados, dois métodos para eliminar as bactérias (HOFFMANN *et al.*, 1986): (1) tratamento pelo calor e (2) emprego de antibiótico. O tratamento pela temperatura de 30 °C não foi eficaz pois a amplificação mostra a presença de fragmentos do gene *wsp* nos adultos que emergiram das pupas tratadas pela alta temperatura (Fig. 5) e, além disso, foi também letal para 20% das pupas tratadas,

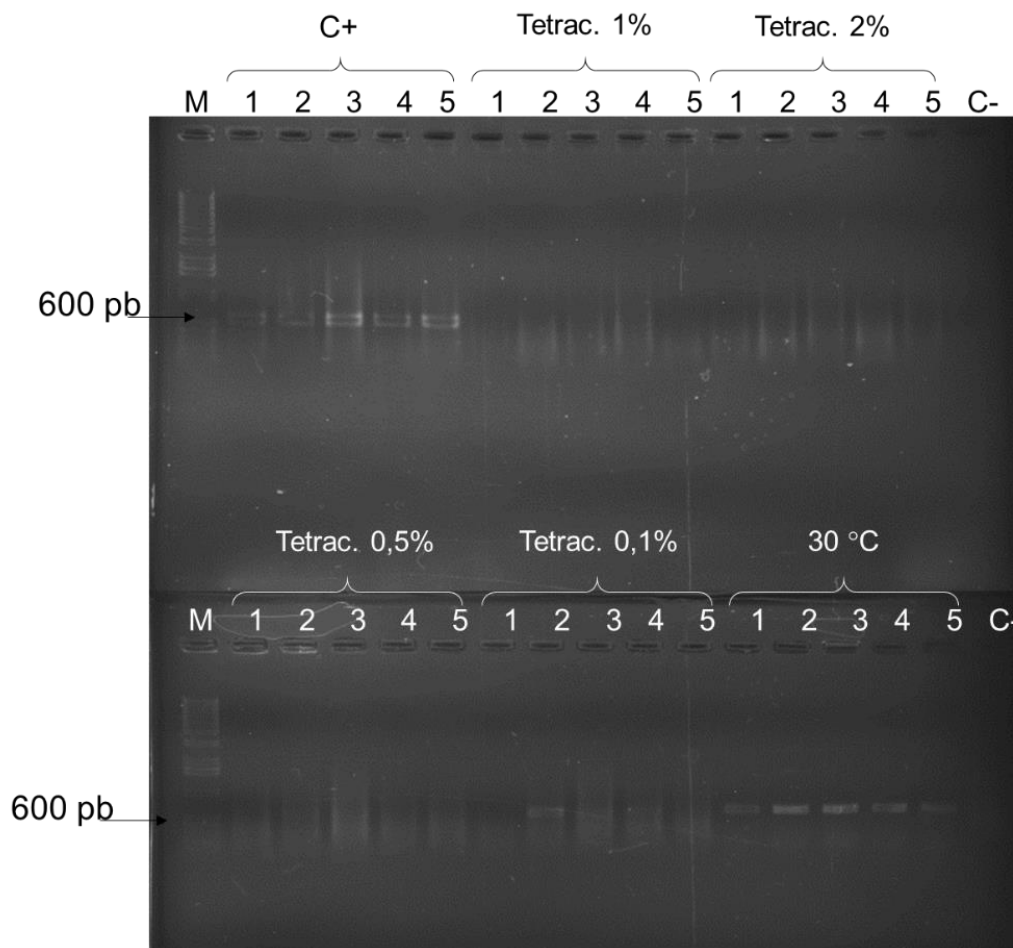
Figura 5: Amplificação do gene *wsp* de 10 moscas nascidas de pupas mantidas a 30 °C. M) Marcador molecular 1 kpb; C+) Controle positivo; C-) Controle negativo.



Fonte: Elaborado pelo autor

Como segundo método de eliminação da *Wolbachia*, empregou-se o tratamento com antibiótico, solução aquosa de Tetraciclina. Inicialmente, foram testadas soluções com diferentes concentrações, 0,1%, 0,5%, 1% e 2%. Os ensaios demonstraram que a solução a 0,1% não foi eficaz, enquanto as três outras testadas, 0,5%, 1% e 2% alcançaram a eliminação da *Wolbachia* (Fig. 6). Deste modo, com a finalidade de minimizar os efeitos do antibiótico nos insetos optou-se pelo emprego da solução, menos concentrada de 0,5%, para obtenção da colônia tratada, isenta de *Wolbachia* e a partir da qual foram realizados os experimentos.

Figura 6: Amplificação do gene *wsp* de cinco indivíduos de cada tratamento. M) Marcador molecular 1 kpb; C+) Controle positivo; C-) Controle negativo.

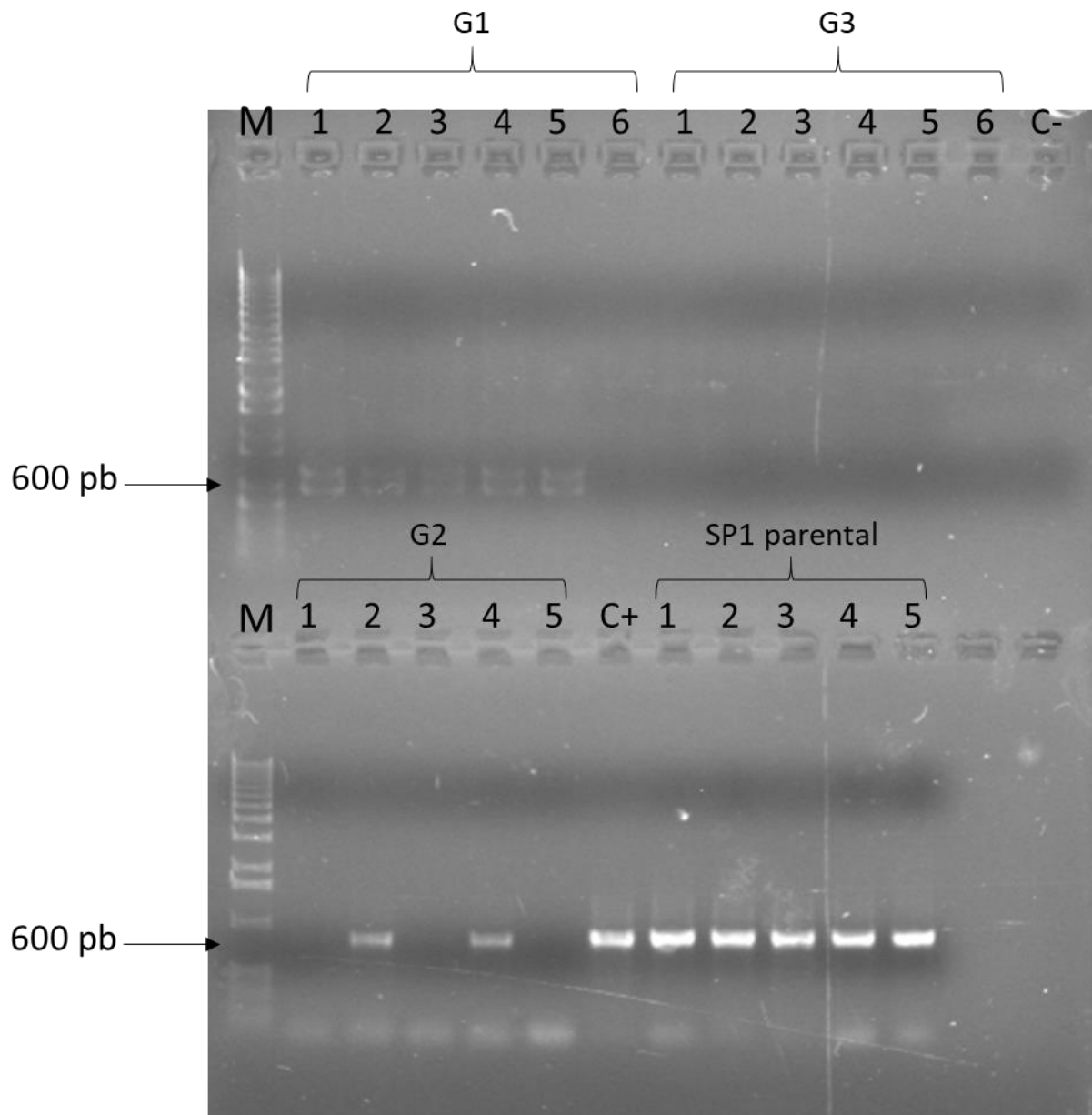


Fonte: Elaborado pelo autor

4.2.2 Obtenção de linhagem de *A. sp1* isenta de *Wolbachia*

A Figura 7 mostra que nas gerações G1 e G2 a *Wolbachia* não havia sido eliminada de todos os espécimes. Em G3, no entanto, a bactéria não foi mais detectada e testes periódicos ao longo das sucessivas gerações, mostraram que não ocorreu a re-infecção pela *Wolbachia* na colônia curada de *A. sp.1* (dados não mostrados).

Figura 7: Eletroforese de fragmentos amplificados do gene *wsp* em indivíduos de distintas gerações tratadas com solução aquosa de tetraciclina a 0,5% de *A. sp.1* parental e nas gerações da linhagem curada.



Fonte: Elaborado pelo autor

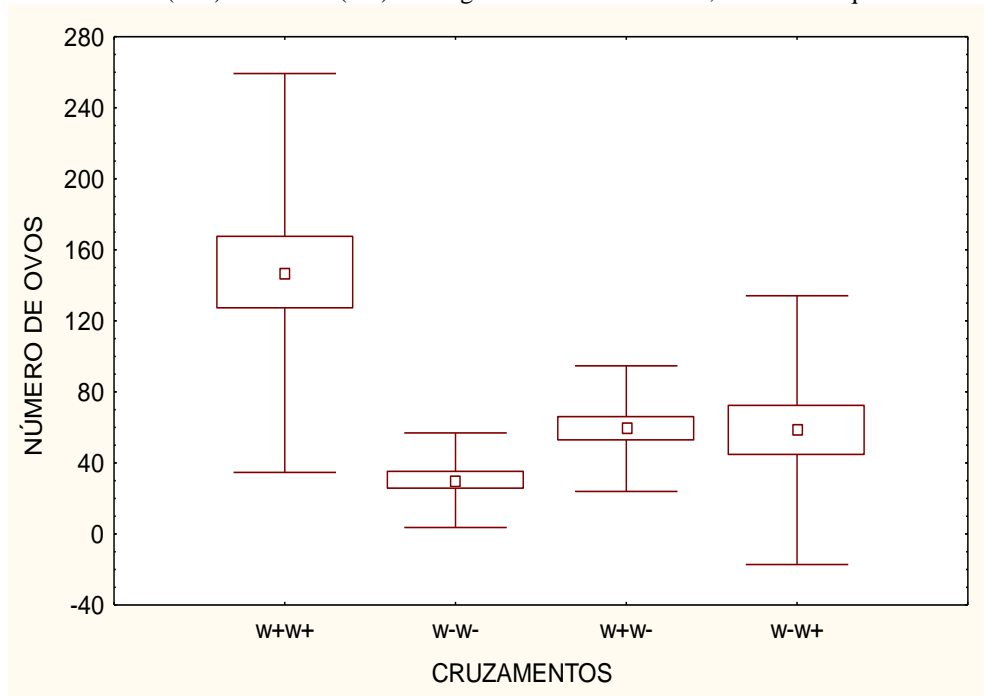
4.3 Parâmetros de desempenho reprodutivo e IC

A fim de se evitar que possíveis efeitos do antibiótico interferissem na interação da bactéria com seu hospedeiro, como já foi demonstrado em *Drosophila* (SNOOK *et al.*, 2000), para realização dos cruzamentos e demais experimentos, foram utilizadas moscas curadas somente a partir da quarta geração das linhagens tratadas pelo antibiótico.

Foram feitos quatro tipos de cruzamentos entre indivíduos e infectados (W+) e não infectados (W-): (1) ♀W+ x ♂W+, (2) ♀W- x ♂W-, (3) ♀W+ x ♂W- e (4) ♀W- x ♂W+, com cinco réplicas para cada um. Para cada réplica foram coletadas seis amostras de ovos, totalizando, assim, 30 amostras para cada cruzamento.

A Figura 8 mostra o número médio de ovos obtidos em cada cruzamento e o teste de Tukey mostrou que os cruzamentos entre indivíduos infectados (♀W+ x ♂W+) produziram maior número de ovos que os demais cruzamentos e que, entre estes, as diferenças não foram significativas. A análise do total de ovos obtidos em cada tipo de cruzamento (5 réplicas e 6 amostras por réplica) pela ANOVA (dados normalizados por transformação em Log), mostrou diferenças significativas ($F = 7,82$; $GL_{\text{feito}} = 3$; $GL_{\text{erro}} = 116$; $p < 0,001^{**}$).

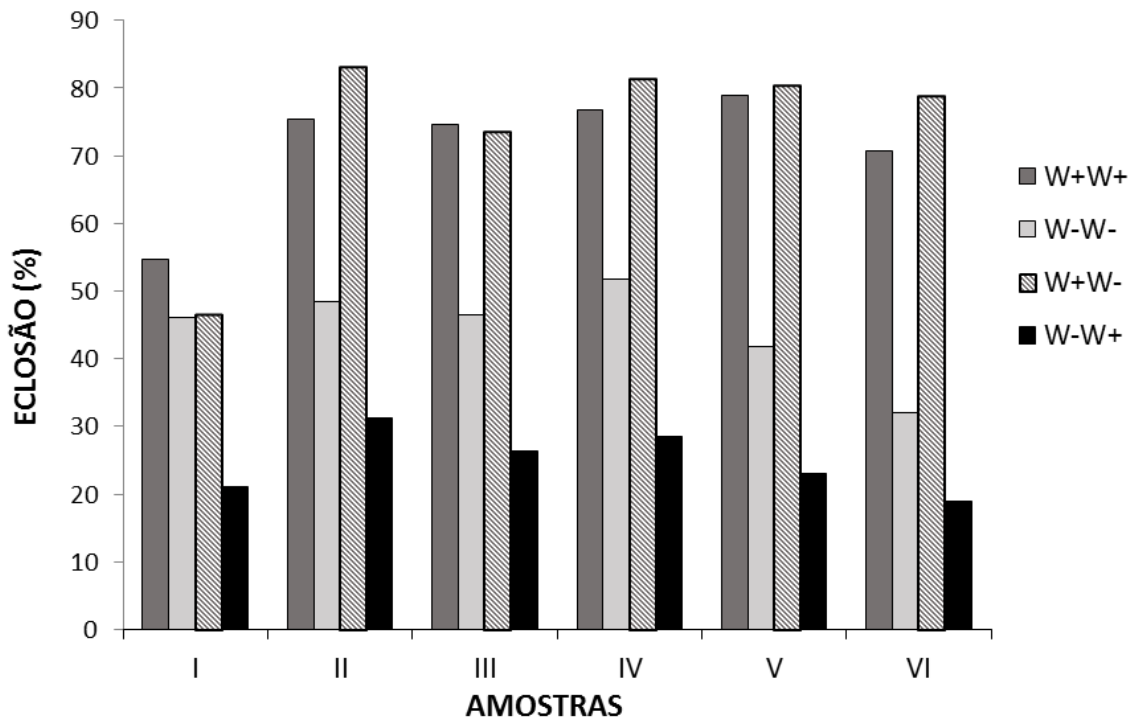
Figura 8: Número médio e desvios padrões de ovos depositados nos quatro tipos de cruzamentos entre indivíduos infectados pela *Wolbachia* (W+) e curados (W-). Na legenda dos cruzamentos, fêmeas à esquerda e machos à direita.



Fonte: Dados da pesquisa

A Figura 9 mostra os dados percentuais da taxa de eclosão média das cinco réplicas de cada tipo de cruzamento nas 6 amostras analisadas ao longo do tempo entre indivíduos infectados pela *Wolbachia* (W+) e curados (W-).

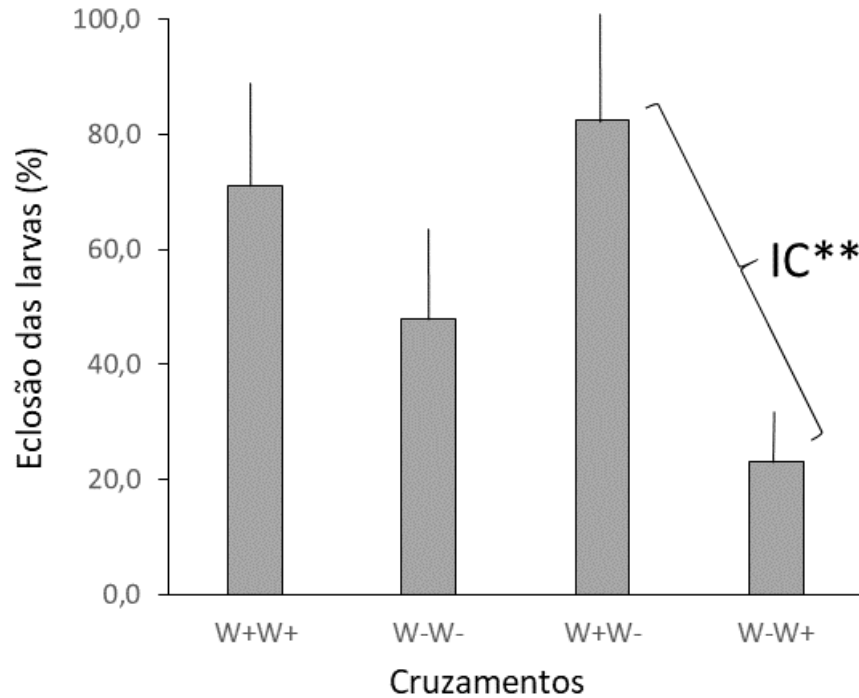
Figura 9: Eclosão média das larvas, oriundas dos quatro tipos de cruzamentos nas seis amostras analisadas ao longo do tempo.



Fonte: Dados da pesquisa

Os valores percentuais foram normalizados pela transformação em arco-seno e analisados pela ANOVA que mostrou existirem diferenças significativas nas taxas de eclosão ($F = 29,82$; $GL_{\text{feito}} = 3$; $GL_{\text{erro}} = 116$; $p < 0,001^{**}$) entre os diferentes cruzamentos. Os valores observados para as fêmeas infectadas são maiores do que os observados para as fêmeas curadas, tanto quando inseminadas por machos infectados como por machos curados. No entanto, diferença significativa foi observada com relação às fêmeas curadas, quando inseminadas por machos também curados foram mais férteis do que em cruzamentos com machos infectados. O resultado deste último tipo de cruzamento é devido à existência de incompatibilidade citoplasmática (IC), ou seja, quando machos infectados cruzam com fêmeas não infectadas. No presente estudo, utilizando-se os valores médios de todas as amostras em conjunto, a IC corrigida foi estimada em 70,25 % (segundo o método de POINSOT *et al.*, 1998) (Fig. 10).

Figura 10: Valores percentuais médios e desvios padrões das taxas de eclosão de larvas nos diferentes cruzamentos entre indivíduos infectados pela *Wolbachia* e curados. Está indicada a existência de incompatibilidade citoplasmática (IC) entre os cruzamentos ♀W+ x ♂W- e ♀W- x ♂W+.



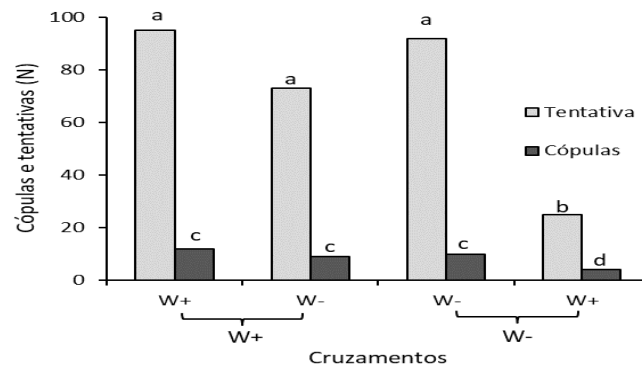
Fonte: Dados da pesquisa

4.4 Testes de escolha de parceiros para acasalamento

Foram feitas cinco réplicas de cada cruzamento e foram registrados o número de tentativas de cópula e o número de cópulas efetivas ocorridas no período de ~6h às 12h (sendo ajustado o horário de da aurora). Assim, o número de eventos de atividade reprodutiva (tentativa de cópulas e cópulas efetivas) foi de 107 entre fêmeas W+ com machos W+ e de 82 com machos W-. Nos cruzamentos entre fêmeas W- com machos W- o número de eventos de atividade reprodutiva foi 102 e com machos W+ foi 29. Esses dados são apresentados na Figura 11. Considerando os valores de cópulas e tentativas de cópulas isoladamente de todas as réplicas, o teste pela ANOVA dos dados normalizados (Log), indicou diferenças significativas entre os cruzamentos ($F = 3,61$; $GL_{\text{efeito}} = 3$; $GL_{\text{erro}} = 16$; $p < 0,037^*$). Apenas para os cruzamentos nos quais as fêmeas curadas escolheram os machos infectados (♀W- x ♂W+), o número de cópulas e de tentativas foi diferente das demais escolhas pelas fêmeas. Além disso, foi registrada a duração

das cópulas efetivas para os distintos pares em cópula, cujos resultados são apresentados na Tabela 1.

Figura 11: Número de cópulas e tentativas de cópula. Os testes de escolha entre machos infectados (W+) e curados (W-) pelas fêmeas infectadas (W+) e curadas (W-). Letras distintas nas barras indicam diferenças significativas (Teste de Tukey).



Fonte: Dados da pesquisa

A Tabela 1 mostra o tempo médio em que os pares ficaram acasalados que variou entre 11 e 315 minutos. Análise pela ANOVA (dados transformados em Log) mostrou que as diferenças na duração do acasalamento não foram significativas ($F = 28,2$, $GL. = 28$, $p = 0,838$).

Tabela 1: Número e duração das cópulas nos cruzamentos de escolha de machos (W+ e W-) pelas fêmeas (W+ e W-).

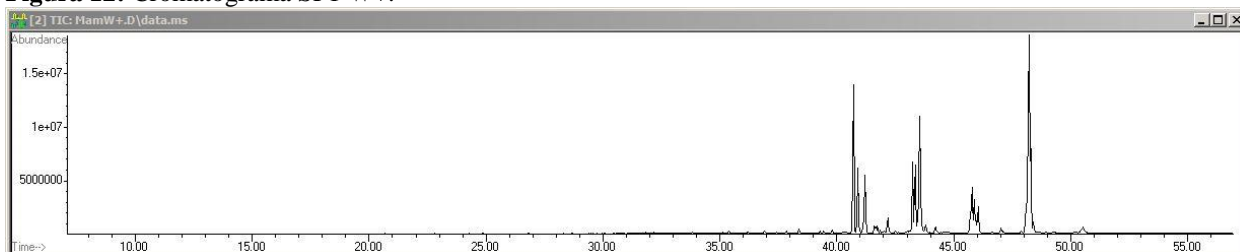
Fêmeas	Machos	Cópulas (n)	Minutos	
			Média	(mín - máx)
W+	W+	11	72,5	(11 - 152)
	W-	9	114	(11 - 315)
W-	W-	10	53	(23 - 98)
	W+	4	62	(16 - 114)

Fonte: Dados da pesquisa

4.5 Análise dos hidrocarbonetos cuticulares

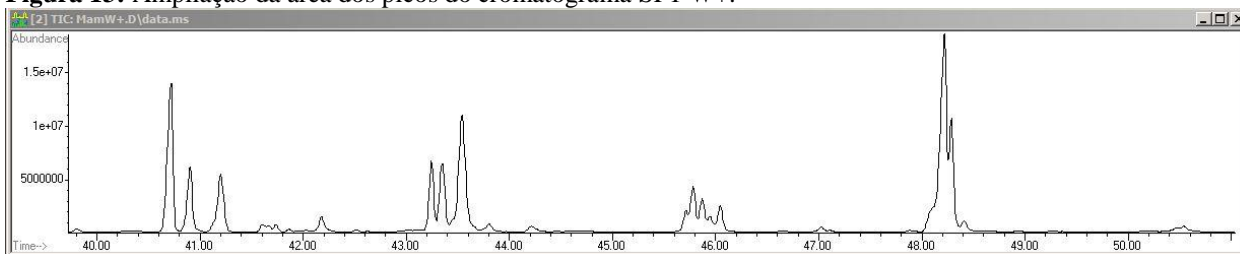
Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitoquímica, sob supervisão direta do Professor Dr. Marcelo José Pena Ferreira, do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências. Os experimentos contaram com dois grupos: machos W+ e machos W-, tendo sido colocados três indivíduos infectados e três curados, em frascos com 300 μ L de hexano por três minutos e posteriormente preservados em álcool 70% a -20 °C. Foram feitas três réplicas de cada experimento e foi aplicado 1 μ L da solução em um CG-EM (Cromatógrafo a Gás acoplado ao Espectrômetro de Massas). Os cromatogramas obtidos estão mostrados nas Figuras 12 a 15, onde se pode notar os diferentes picos de hidrocarbonetos entre os tempos de retenção de 40 a 50 minutos.

Figura 12: Cromatograma SP1 W+.



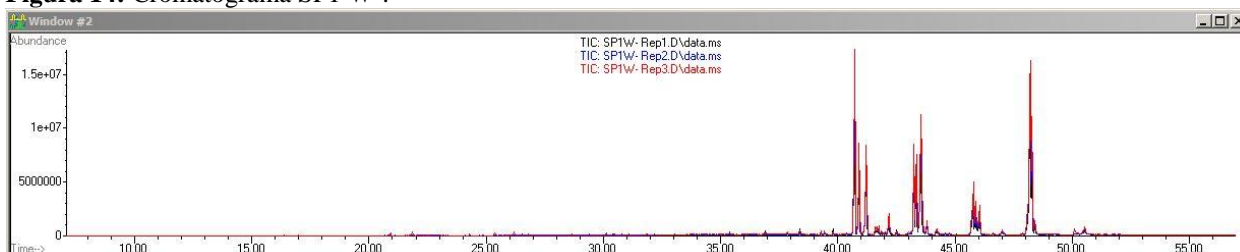
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 13: Ampliação da área dos picos do cromatograma SP1 W+.

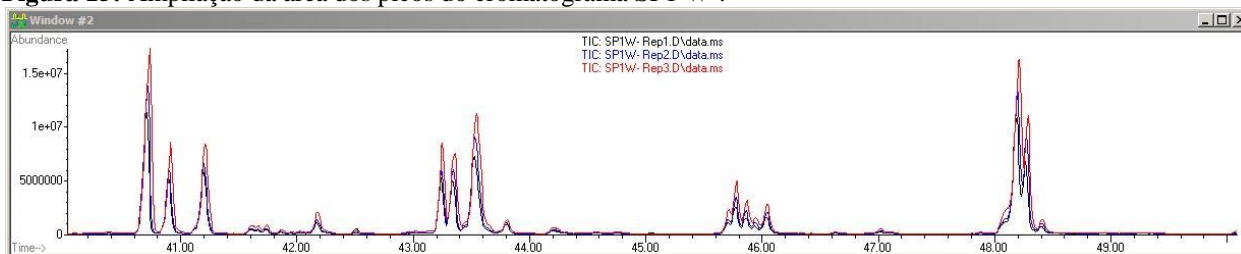


Fonte: Dados da pesquisa

Figura 14: Cromatograma SP1 W-.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 15: Ampliação da área dos picos do cromatograma SP1 W-.

Fonte: Dados da pesquisa

A análise dos dados foi feita através do levantamento de todos os hidrocarbonetos presentes e a comparação das porcentagens totais relativas aos picos de hidrocarbonetos das três réplicas. A soma das porcentagens de todos os hidrocarbonetos foi superior a 97%. Assim, foi calculada as médias e desvios padrões da porcentagem total de cada análise. Os dados mostraram que as moscas infectadas possuem alteração na concentração de mais da metade dos hidrocarbonetos cuticulares, além da produção de alguns que não estão presentes nas amostras de *A. sp.1* sem infecção. A amostra de SP1 W+ apresenta pelo menos sete hidrocarbonetos a mais em comparação com as amostras de SP1 W- e a ausência de um hidrocarboneto com tempo de retenção de 48,322 minutos (Tabela 2).

Tabela 2: Média da porcentagem total da área de cada pico dos cromatogramas das três réplicas. Em amarelo os compostos que diferem entre as duas amostras. T. R. min) Tempo de Retenção em minutos.

SP1 W-			SP1 W+		Significativo
T. R. min	% do total	Desvio Padrão	T. R. min	% do total	
40,722	15,566%	0,06%	40,722	13,212%	sim
40,906	6,502%	0,30%	40,907	5,608%	sim
41,205	8,127%	0,56%	41,203	6,097%	sim
41,612	0,453%	0,24%	41,611	0,627%	não
			41,668	0,420%	
			41,739	0,562%	
42,177	1,805%	0,15%	42,181	1,603%	sim
43,246	6,308%	0,24%	43,247	5,295%	sim
43,349	6,684%	0,08%	43,352	6,235%	sim
43,542	13,913%	0,43%	43,543	14,091%	não
43,806	1,228%	0,22%	43,807	1,028%	não
			44,218	0,759%	
45,711	1,349%	0,20%	45,716	1,618%	sim
45,779	3,489%	0,15%	45,785	3,815%	sim
45,867	2,254%	0,19%	45,872	2,817%	sim
			45,948	1,200%	
46,043	2,389%	0,06%	46,048	2,396%	não

			47,027	0,247%	
48,201	17,776%	0,05%	48,220	22,231%	sim
			48,288	8,477%	
48,322	8,225%	0,55%			
48,409	1,059%	0,09%	48,412	0,992%	não
			50,543	0,670%	
	Total SP1 W-			Total SP1 W+	
	97,13%			100,0%	

Fonte: Dados da pesquisa

5 DISCUSSÃO

A detecção de *Wolbachia* na colônia de *A. sp.1 aff. fraterculus* pela amplificação do gene *wsp* mostrou que todos os indivíduos testados da colônia estavam naturalmente infectados pela bactéria. Altos índices de infecção por *Wolbachia* para espécies de *Anastrepha* foram descritos anteriormente (COSCRATO *et al.*, 2009; PREZOTTO *et al.*, 2017). Já a identificação da linhagem, feita pela amplificação e sequenciamento dos cinco genes propostos pelo método MLST, mostrou tratar-se de uma linhagem ainda não descrita. A identificação das linhagens de *Wolbachia* e caracterização de sua diversidade genética, inicialmente era feita utilizando-se o gene 16S rRNA (O'NEILL *et al.*, 1992) e o gene *wsp*, codificante da proteína variável de membrana (ZHOU *et al.*, 1998). Entretanto, a taxa evolutiva lenta do 16S rRNA e a descoberta de alta taxa de recombinação no gene *wsp*, dificultavam a caracterização das diferentes linhagens da bactéria, bem como a resolução de sua filogenia. Assim, para contornar essas dificuldades foi proposto o método MLST (do inglês, *Multilocus Sequence Typing*) como o método padrão (BALDO *et al.*, 2006) e por essa razão foi o método aqui utilizado. Segundo a metodologia MLST são reconhecidos supergrupos filogenéticos identificados por letras (A-H) (ZHOU *et al.*, 1998). Os supergrupos A e B são os comumente encontrados em artrópodes, sendo caracterizados frequentemente como parasitas reprodutivos (LO *et al.*, 2007; VANDEKERCKHOVE *et al.*, 1999) que manipulam a reprodução do hospedeiro de modo a favorecer o aumento e dispersão de suas próprias populações. Entretanto, recentemente, com o sequenciamento total dos genomas, verificou-se que a diversidade de linhagens pode ser ainda maior (BLEIDORN; GERTH, 2018).

A linhagem de *Wolbachia* detectada no presente trabalho e identificada pela metodologia MLST mostrou ser pertencente ao supergrupo A. Esse resultado está de acordo com o descrito para outras amostras de *Anastrepha* (COSCRATO *et al.*, 2009; MASCARENHAS *et al.*, 2016; PREZZOTO *et al.*, 2017). Entretanto, a linhagem caracterizada através dos alelos encontrados para os cinco genes mostrou tratar-se de linhagem ainda não descrita. Variabilidade genética entre linhagens de *Wolbachia* caracterizadas pela metodologia MLST foi descrita para amostras do complexo *fraterculus* da região Neotropical, incluindo Brasil, Argentina, Peru, Equador, Colômbia, Guatemala e México, para as quais foram descritas cerca de 20 linhagens diferentes (PREZZOTO *et al.*,

2017). Entretanto, não foram feitas associações entre essas linhagens e o tipo de relação estabelecida com seu hospedeiro.

Em artrópodes, existem uns poucos casos nos quais a *Wolbachia* age como mutualista obrigatória. Por exemplo, fêmeas da vespa parasita *Asobara tabida* tratadas com antibiótico e isentas de *Wolbachia*, apresentaram o desenvolvimento dos ovos totalmente comprometido (DEDEINE *et al.*, 2001). No percevejo *Cimex lectularius*, a redução ou eliminação da *Wolbachia* por tratamento com antibiótico resultou no desenvolvimento anormal dos ovos, o qual foi restaurado com o fornecimento de suplemento alimentar de Vitamina B e biotina, reforçando a hipótese que, nesse caso, a *Wolbachia* teria um papel relevante no fornecimento de micronutrientes para o hospedeiro, mas que este não dependeria dela para a sobrevivência e fecundidade (NIKOH *et al.*, 2014). Já em *D. melanogaster* foi descrita a associação entre a presença da *Wolbachia* e alterações no metabolismo do hospedeiro (BROWNLIE *et al.*, 2009) e em dípteros ainda estão descritos casos nos quais a presença da *Wolbachia* é positiva causando um aumento da longevidade e fertilidade (FAST *et al.*, 2011; DOBSON *et al.*, 2002), ou seja existe uma diversidade nas relações mutualísticas entre *Wolbachia* e seus hospedeiros, embora os mecanismos moleculares subjacentes sejam ainda bastante desconhecidos (FRY; RAND, 2002). O fato das maiores taxas de eclosão das larvas no presente trabalho terem sido observadas em fêmeas (W+) quando comparadas às fêmeas (W-) sugere que possa existir um efeito positivo da presença do endossimbionte na fertilidade das fêmeas, semelhante ao descrito para outras espécies de dípteros. Entretanto, o sucesso no estabelecimento da colônia de *A. sp.1* (W-) através do tratamento com o antibiótico tetraciclina sugere que não há uma dependência da presença da *Wolbachia* para a sobrevivência e reprodução em condições de laboratório.

Apesar da incompatibilidade citoplasmática (IC), descrita por Laven (1967) ser uma das alterações reprodutivas causadas pela *Wolbachia* mais frequente entre os insetos (BOURTZIS *et al.*, 2003) sua ocorrência parece estar vinculada tanto a certas características da linhagem da *Wolbachia* quanto também de seu hospedeiro ou, em outras palavras, não é possível assumir-se que a simples presença da bactéria produza o efeito IC. Linhagens de *Wolbachia* presentes em amostras de *A. sp.1* da Argentina, diferentes da aqui descrita mostraram causar o fenótipo morte dos machos (*male killing*), enquanto outras mostraram causar o fenótipo IC em diferentes morfotipos do complexo *fraterculus* (CONTE *et al.*, 2019; DEVESCOVI *et al.*, 2019). Além disso, a incidência da IC é possivelmente também dependente do tempo da associação de uma dada linhagem com seu hospedeiro (TURELLI,

1994). Em tefritídeos, a estratégia amplamente utilizada para demonstrar o efeito de IC e que foi utilizada no presente trabalho, envolve o estabelecimento de linhagens do hospedeiro em questão, isentas de *Wolbachia*, obtidas por tratamento térmico ou por antibióticos (BOURTZIS *et al.*, 2003), com posterior cruzamento dos indivíduos tratados (W-) com indivíduos infectados (W+). O tratamento térmico, no presente estudo, mostrou-se ineficiente para a eliminação da *Wolbachia*, ao contrário do que foi observado por Ribeiro (2009) e Prezotto (2012) que descreveram a eliminação das bactérias através desse método. Talvez essa discrepância esteja relacionada às diferentes linhagens de *Wolbachia* presentes nos hospedeiros, podendo existir diferenças na susceptibilidade à altas temperaturas, pois a prevalência de infecção por certas linhagens de *Wolbachia* em regiões com distintos regimes térmicos foi descrita em himenópteros (SHOEMAKER *et al.*, 2000). Já o tratamento para eliminação da *Wolbachia* por administração de solução aquosa de tetraciclina, mostrou-se efetivo para o estabelecimento da colônia isenta de *Wolbachia* (W-). É relevante notar que a concentração da solução aquosa de tetraciclina aqui utilizada (0,5%) está abaixo das comumente utilizadas, em geral de 2-5% (ALAM *et al.*, 2011; NGUYEN *et al.*, 2017; LV *et al.*, 2021).

A incompatibilidade citoplasmática pode ocorrer de duas formas, unidirecional ou bidirecional. Na unidirecional, a morte do embrião resulta do cruzamento entre machos infectados, com fêmeas não infectadas ou do cruzamento de machos e fêmeas portadoras de linhagens de *Wolbachia* assimetricamente incompatíveis. Já na incompatibilidade bidirecional, a morte dos embriões é resultado do cruzamento entre machos e fêmeas portadoras de linhagens reciprocamente incompatíveis. O estabelecimento da colônia W- de *A. sp.1* no presente estudo e posterior cruzamento entre indivíduos W+ e W-, simula a situação prevista na incompatibilidade unidirecional e de fato foram observados valores significativamente reduzidos na taxa de eclosão das larvas no cruzamento entre machos W+ e fêmeas W-, concluindo-se que essa linhagem de *Wolbachia* detectada nos indivíduos *A. sp.1* é causadora do fenótipo IC. Aqui o valor de IC alcançou cerca de 70%. Algumas linhagens de *Wolbachia* são capazes de causar uma IC ainda maior como foi descrito no díptero *Glossina morsitans*, cuja linhagem de *Wolbachia* produziu 80 % de IC (ALAM *et al.*, 2011). É relevante notar que a IC completa, ou seja 100% é causada apenas por umas poucas linhagens de *Wolbachia* em alguns hospedeiros, tais como *Culex pipiens* (LAVEN, 1967), *C. capitata* e *Rhagoletis cerasi* (RIEGLER; STAUFFER, 2002; ZABALOU *et al.*, 2004).

Embora seja pouco estudada em nível citológico, verificou-se que na IC, os pró-núcleos feminino e masculino tornam-se assíncronos, resultando na segregação anormal dos cromossomos na anáfase mitótica (TRAM; SULLIVAN, 2002). Os cromossomos da fêmea segregam-se normalmente, enquanto os cromossomos dos machos exibem uma série de defeitos, como pontes cromatídicas e segregação anômala, resultando na inviabilidade logo nos primeiros estágios da embriogênese (BONNEAU *et al.*, 2018; LANDMANN *et al.*, 2009). Estudos citológicos futuros poderão responder se alterações citológicas similares a essas descritas na literatura seriam responsáveis pela IC aqui detectada.

Devido a existência e características do fenótipo IC, considera-se que a *Wolbachia* poderia ter um papel promotor ou adjuvante nos processos de especiação de seus hospedeiros, por promover o isolamento reprodutivo entre duas populações (BRUCKER; BORDENSTEIN, 2012; SHROPSHIRE; BORDENSTEIN, 2016). Por exemplo, a IC induzida por *Wolbachia* poderia reduzir o fluxo de genes nucleares entre seus hospedeiros na ausência da divergência genética dos hospedeiros ou isolamento por barreiras geográficas (HURST; SCHILTHUIZEN, 1998). Supõe-se que isolamento causado pela presença de *Wolbachia* possa ter sido promotor da divergência entre espécies crípticas do microhimenóptero *Nasonia* que divergiram há ~1 milhão de anos (BORDENSTEIN *et al.*, 2001). A descrição de fenótipo IC causado por uma linhagem de *Wolbachia* em uma espécie do complexo *fraterculus* abre perspectivas para que novos estudos investiguem em profundidade esse fenômeno e considere-se a possibilidade de que situação similar possa ter ocorrido nos processos de divergência entre as espécies do complexo *fraterculus*.

Adicionalmente, as análises dos perfis dos hidrocarbonetos cuticulares evidenciaram que a presença de *Wolbachia* altera a composição destes, aumentando ou diminuindo a concentração de alguns componentes e levando à produção de novos hidrocarbonetos ou a deleção de alguns deles. Desde que os hidrocarbonetos são parte do sistema de reconhecimento espécie-específico durante a corte e cópula (LIMA *et al.*, 2001; CÁCERES *et al.*, 2009), a presença de *Wolbachia* pode ser um fator também atuante nos mecanismos de isolamento pré-zigótico. Os hidrocarbonetos são sintetizados a partir de precursores do corpo gorduroso e depositados na cutícula dos insetos e são apolares, pouco voláteis e tem um papel crucial nos sistemas de reconhecimento de parceiros sexuais espécie-específicos (BLOMQUIST; BAGNÈRES, 2010; KATHER; MARTIN, 2012). Devido a sua especificidade, os perfis dos hidrocarbonetos cuticulares tem sido extensivamente utilizados para o reconhecimento de espécies crípticas, em diversas famílias de insetos, como

Termitoidae (HAVERTY *et al.*, 2000), Miridae (GEMENO *et al.*, 2012), Drosophilidae (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; JENNINGS *et al.*, 2014) e Tephritidae (VANÍČKOVÁ *et al.*, 2014, 2015b) dentre outros.

No complexo *fraterculus* o papel dos hidrocarbonetos cuticulares, tem sido investigado e considera-se que além de sua especificidade entre as diferentes espécies eles tenham papel preponderante na comunicação entre machos e fêmeas durante o comportamento reprodutivo (VANÍČKOVÁ *et al.*, 2012). Os resultados das análises dos hidrocarbonetos nas colônias W+ e W- de *A. sp.1* e os resultados dos testes de escolha de parceiros sexuais, descritos nesse trabalho reforçam essa hipótese. A discriminação na escolha de parceiros sexuais entre indivíduos infectados e não-infectados por *Wolbachia*, também foi descrita em espécies de *Drosophila* (JAENIKE *et al.*, 2006; SHOEMAKER *et al.*, 1999).

A incompatibilidade citoplasmática tem sido também utilizada no desenvolvimento de estratégias de controle populacional de insetos-praga e vetores (revisão em BATON *et al.*, 2021).

A chamada técnica do inseto incompatível (TII) é análoga à técnica do inseto estéril (TIE) e ambas são alternativas mais sustentáveis do que os métodos tradicionais de controle que empregam agentes químicos sintéticos (DYCK *et al.*, 2021). A TIE baseia-se na produção em larga escala do inseto-alvo em biofábricas e a liberação de machos esterilizados por radiação na área de interesse. Os machos estéreis, acasalam com as fêmeas “selvagens” residentes daquela área, resultando em progênie inviáveis e assim reduzindo o tamanho da população-alvo na próxima geração. Aplicando-se esse procedimento repetidas vezes obtém-se o decréscimo da população alvo a níveis manejáveis. Essa estratégia tem sido aplicada com sucesso em programas de controle de moscas-das-frutas da família Tephritidae como *Anastrepha ludens*, a mosca-das-frutas mexicana, e *Ceratitis capitata*, a chamada mosca-das-frutas do mediterrâneo (BATON *et al.*, 2021).

De maneira análoga ao TIE a técnica do inseto incompatível (TII) utiliza a infecção por endossimbiontes, especialmente *Wolbachia*, em alternativa à radiação, liberando machos reprodutivamente incompatíveis com fêmeas residentes da população-alvo (BOURTZIS *et al.*, 2014; SCOTT; BENEDICT, 2016; XI; JOSHI, 2016). Embora essa estratégia tenha sido idealizada e aplicada há bastante tempo, de 1990 até o presente, um renovado e crescente interesse tem movimentado a comunidade científica, estando em curso estudos sobre a aplicação do TII para controle de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (ZABALOU *et al.*, 2004,

2009; KYRITSIS *et al.*, 2019), e a mosca das frutas da azeitona, *Bactrocera oleae* Rossi (APOSTOLAKI *et al.*, 2011).

Uma vez que a existência da IC é o componente-chave para o desenvolvimento da técnica do inseto incompatível (TII), o presente trabalho traz também uma contribuição significativa para o cenário atual de busca de estratégias ambientalmente mais sustentáveis para o controle de insetos-praga. Entretanto, os resultados aqui apresentados, indicam que a interferência da *Wolbachia* na composição dos hidrocarbonetos cuticulares e na escolha dos parceiros para acasalamento, deve ser considerada no desenvolvimento dessas metodologias.

6 CONCLUSÕES

As conclusões obtidas através do presente estudo foram:

- ✓ A colônia de *Anastrepha* sp1 *aff. fraterculus* apresentava uma alta frequência de infecção, pois todos os indivíduos amostrados estavam infectados;
- ✓ A linhagem de *Wolbachia* foi identificada, através do método MLST como pertencente ao supergrupo A, como já havia sido descrito para outras espécies de *Anastrepha*, mas não foi reconhecida como nenhuma das linhagens já descritas;
- ✓ O tratamento com melhor desempenho para remoção da infecção por *Wolbachia* foi o tratamento com solução aquosa de tetraciclina a 0,5%;
- ✓ As diferenças observadas nos parâmetros de desempenho reprodutivo em cruzamentos entre as colônias W- e W+ sugerem que, neste caso, a *Wolbachia* pode ter um efeito positivo para o hospedeiro;
- ✓ A presença da *Wolbachia* interfere na composição dos hidrocarbonetos cuticulares e na escolha de parceiros para o acasalamento;
- ✓ A linhagem de *Wolbachia* encontrada na colônia de *A. sp.1 aff. fraterculus* é capaz de produzir o fenótipo IC unidirecional no hospedeiro da ordem de ~ 70%;
- ✓ A existência de IC, componente-chave na Técnica do Inseto Incompatível (TII) abre perspectivas para o desenvolvimento de métodos de controle populacional mais sustentáveis para essa espécie-praga. Entretanto, a interferência na composição dos hidrocarbonetos cuticulares e na escolha de parceiros para o acasalamento devem ser consideradas no desenvolvimento dessas metodologias.

RESUMO

As moscas-das-frutas são insetos pertencentes à família Tephritidae que utilizam frutos como hospedeiro para o desenvolvimento das larvas. Caso o fruto utilizado tenha valor comercial, caracteriza-se esta espécie de mosca como praga agrícola. Uma das espécies mais importantes economicamente é a espécie nominal *Anastrepha fraterculus* que congrega um grupo de espécies crípticas. As formas de controle incluem o uso de inseticidas químicos em forma de spray ou iscas para o controle das populações. Há também o uso de métodos alternativos, como controle biológico e a aplicação da técnica do inseto estéril, considerados métodos de controle mais sustentáveis que a aplicação de inseticidas químicos. A *Wolbachia* é uma bactéria intracelular obrigatória que infecta vários grupos de artrópodes e nemátodes, é transmitida via maternal (transmissão vertical), mas pode ser transmitida através de outras espécies (transmissão horizontal). A *Wolbachia* causa modificações reprodutivas de várias formas, tais como: incompatibilidade citoplasmática, morte dos machos, feminização dos machos, partenogênese e mudanças comportamentais. A incompatibilidade citoplasmática resulta na inviabilidade dos ovos e pode ser utilizada como um mecanismo de controle biológico de insetos praga e vetores de doenças. No presente trabalho foi selecionada uma colônia de *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus* (A. sp1), 100% infectada pela bactéria *Wolbachia pipientis*, mantida em biotério há mais de 30 gerações. Foram amplificados e sequenciados fragmentos dos genes *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *ftsZ* e *fbpA*, que integram a metodologia de MLST ("*Multiloci Sequence Typing*"), sendo identificada como similar a cepa Afra_A_wMx2 do supergrupo A. Dois tratamentos foram testados para eliminar a infecção pela bactéria, tratamento térmico a 30 °C e tratamento com solução aquosa de tetraciclina, sendo este último mais eficiente na concentração de 0,5%. A partir da quarta geração foram iniciados os experimentos propostos no trabalho. A partir de cruzamentos entre indivíduos infectados e não-infectados detectou-se um efeito positivo da *Wolbachia* em parâmetros de desempenho reprodutivo, com maiores valores para eclosão das larvas em indivíduos W+ (76%) do que W- (42%). O cruzamento entre fêmeas W- e machos W+ mostrou a existência de incompatibilidade citoplasmática (IC~70%). As análises sobre a composição dos hidrocarbonetos cuticulares e preferência na escolha de parceiros sexuais entre indivíduos W+ e W- mostrou que há interferência da *Wolbachia* sobre esses parâmetros. A existência de IC, componente-chave na Técnica do Inseto Incompatível (TII), abre perspectivas para o desenvolvimento de métodos de controle populacional mais sustentáveis para essa espécie-praga. Entretanto, a interferência na composição dos hidrocarbonetos cuticulares e na escolha de parceiros para o acasalamento, devem ser consideradas no desenvolvimento dessas metodologias.

Palavras-chaves: *Wolbachia pipientis*. *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus*. Incompatibilidade citoplasmática. Preferência sexual. Hidrocarbonetos cuticulares.

ABSTRACT

Fruit flies of the Tephritidae family are insects that use fruits for larval development. In case the fruit is of commercial value the species of fly is characterized as an agricultural pest. One of the most economically important species is the binominal species *Anastrepha fraterculus*, which comprises a group of cryptic species. The methods of control of these insect pests include the use of chemical insecticides in the form of spray or baits. to control populations. There is also the use of alternative methods, such as biological control and the application of the sterile insect technique (SIT), considered to be more sustainable control methods than the application of chemical insecticides. *Wolbachia* is an obligatory intracellular bacterium that infects several groups of arthropods and nematodes, is maternally transmitted (vertical transmission), although can be also horizontally transmitted. *Wolbachia* causes reproductive alterations in several ways, such as: cytoplasmic incompatibility, male killing, male feminization, parthenogenesis, and behavioral changes. Cytoplasmic incompatibility concerns to egg unviability and have been used in alternative control methodologies of insect pests and disease vectors, such as the Incompatible Insect Technique (IIT). In the present study, reproductive effects of *Wolbachia* infection were analyzed in a laboratory colony of *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus* (A. sp1), 100% naturally infected by *Wolbachia pipientis* and kept in laboratory conditions for more than 30 generations. Fragments of the *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *ftsZ* and *fbpA* genes, which integrate the MLST methodology ("Multiloci Sequence Typing"), were amplified and sequenced, being identified as similar to the Afra_A_wMx2 strain of supergroup A. To eliminate the *Wolbachia* infection, two treatments were tested: pupae heat treatment at 30 °C and adult treatment with water solution of tetracycline, the latter being more efficient at 0.5% concentration. From the fourth generation on, the experiments started. In the crosses between W+ individuals compared to crosses of W- individuals, a positive effect of *Wolbachia* was detected in parameters of reproductive performance, with higher values of egg hatching rate in W+ individuals (76%) when compared to those of W- (42%). Crosses between W- females and W+ males showed the existence of cytoplasmic incompatibility (CI~70%). The analyzes on the composition of cuticular hydrocarbons and reproductive mate choice tests between W+ and W- individuals, showed that there is interference from *Wolbachia* on these parameters. The existence of CI, a key component in the Incompatible Insect Technique (IIT), opens perspectives for the development of more sustainable population control methods for this pest species. However, interference in the composition of cuticular hydrocarbons and in the sexual partner choice, must be considered in the development of these methodologies.

Keywords: *Wolbachia pipientis*. *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus*. Cytoplasmic incompatibility. Sexual preference. Cuticular hydrocarbons.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S.; RULL, J.; MENDOZA, M.; LIENDO, M. C.; DEVESCOVI, F.; RORIZ, A. K.; KOVALESKI, A.; SEGURA, D. F.; VERA, M. T. Differences in sperm storage and remating propensity between adult females of two morphotypes of the *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) cryptic species complex. **Bull. Entomol. Res.**, v. 104, p. 376-382, 2014.
- ALAM, U.; MEDLOCK, J.; BRELSFOARD, C.; PAIS, R.; LOHS, C.; BALMAND, S.; CARNOGURSKY, J.; HEDDI, A.; TAKAC, P.; GALVANI, A.; AKSOY, S. *Wolbachia* Symbiont Infections Induce Strong Cytoplasmic Incompatibility in the Tsetse Fly *Glossina morsitans*. **PLoS Pathog.**, v. 7, n. 12, e1002415, 2011.
- ALBERTSON, R.; TAN, V.; LEADS, R. R.; REYES, M.; SULLIVAN, W.; CASPER-LINDLEY, C. *Wolbachia* distribution in *Drosophila* brains. **Cell Microbiol.**, v. 15, p. 1527-1544, 2013.
- ALUJA, M. Bionomics and management of *Anastrepha*. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 39, p. 155-178, 1994.
- APOSTOLAKI, A.; LIVADARAS, I.; SARIDAKI, A.; CHRYSARGYRIS, A.; SAVAKIS, C.; BOURTZIS, K. Transinfection of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* with *Wolbachia*: towards asymbiont-based population control strategy. **J. Appl. Entomol.**, v. 13, p. 546-553, 2011.
- ARTHOFER, W.; RIEGLER, M.; SCHNEIDER, D.; KRAMMER, M.; MILLER, W. J.; STAUFFER, C. Hidden *Wolbachia* diversity in field populations of the European cherryfruit fly, *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). **Mol. Ecol.**, v.18, p. 3816-3830, 2009.
- ATYAME, C. M.; PASTEUR, N.; DUMAS, E.; TORTOSA, P.; TANTELY, M. L.; POCQUET, N.; LICCIARDI, S.; BHEECARRY, A.; ZUMBO, B.; WEILL, M.; DURON, O. Cytoplasmic incompatibility as a means of controlling *Culex pipiens quinquefasciatus* mosquito in the islands of the southwestern Indian Ocean. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 12, p. 1-10, 2011.
- AUGUSTINOS, A. A.; SANTOS-GARCIA, D.; DIONYSSOPOULOU, E.; MOREIRA, M.; PAPAPANAGIOTOU, A.; SCARVELAKIS, M.; DOUDOUMIS, V.; RAMOS, S.; AGUIAR, A. F.; BORGES, P. A. V.; KHADEM, M.; LATORRE, A.; TSIAMIS, G.; BOURTZIS, K. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in natural populations of Aphids: is the hidden diversity fully unraveled? **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. 1-11, 2011.
- BAKER, A.C.; STONE, W.E.; PLUMMER, C.C.; MACPHAIL, H. **A review of studies on the Mexican fruit fly and related Mexican species.** US Department of Agriculture, Miscel. Publ. 1944. 155p.
- BALDO, L.; DUNNING-HOTOPP, J. C.; JOLLEY, K. A.; BORDENSTEIN, S.; BIBER, A. S.; CHOUDHURY, R. R.; HAYASHI, C.; MAIDEN, M. C. J.; TETTELIN, H.; WERREN, J. H. Multilocus Sequence Typing System for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. **Appl. Environ. Microb.**, v. 72, n. 11, p. 7098-7110, 2006.

- BALDO, L.; DESJARDINS, C. A.; RUSSELL, J. A.; STAHLHUT, J. K.; WERREN, J. H. Accelerated microevolution in an outer membrane protein (OMP) of the intracellular bacteria *Wolbachia*. **BMC Evol. Biol.**, v. 10, n. 48, 2010.
- BARR, N. B.; CUI, L.; MCPHERON, B. A. Molecular systematics of nuclear gene period in genus *Anastrepha* (Tephritidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 98, p. 173-180, 2005.
- BATON, L. A.; ZHANG, D.; LI, Y.; XI, Z. Combining the incompatible and sterile insect techniques for pest and vector control, p. 367-404. In: HENDRICHS, J.; PEREIRA, R.; VREYSEN, J. B. (Eds.) **Area-wide integrated pest management: Development and field application**. CRC Press, Boca Raton, Fa, USA, 2021.
- BLEIDORN, C; GERTH, M. A critical re-evaluation of multilocus sequence typing (MLST) efforts in *Wolbachia*. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 94, n. 1, p. fix163, 2018.
- BLOMQUIST, G. J.; BAGNÈRES, A. (Eds.). **Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology**. Cambridge University Press, New York, USA, 2010.
- BONNEAU, M.; LANDMANN, F.; LABBÉ, P.; JUSTY, F.; WEILL, M.; SICARD, M. The cellular phenotype of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* in the light of cidB diversity. **PLoS Pathog.**, V. 14, n. 10, e1007364. 2018.
- BORDENSTEIN, S. R.; O'HARA, F. P.; WERREN, J. H. *Wolbachia*-induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. **Nature**, v. 409, p. 707-710, 2001.
- BOURTZIS, K.; O'NEILL, S. L. *Wolbachia* infections and arthropod reproduction. **Bioscience**, v. 48, p. 287-293, 1998.
- BOURTZIS, K.; BRAIG, H. R.; KARR, T. L. Cytoplasmic Incompatibility. p. 217-246. In: BOURTZIS, K.; MILLER, T. A. (Eds.). **Insect Symbiosis**. CRC Press. Boca Raton, Florida, 2003.
- BOURTZIS, K.; DOBSON, S. L.; XI, Z.; RASGON, J. L.; CALVITTI, M.; MOREIRA, L. A.; BOSSIN, H.; MORETTI, R.; BATON, L. A.; HUGHES, G. L.; MAVINGUI, P.; GILLES, J. R. L. Harnessing mosquito-*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control. **Acta Trop.**, v. 132, p. S150-S163, 2014.
- BOYLE, L.; O'NEILL, S. L.; ROBERTSON, H. M.; KARR, T. L. Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. **Science**, v. 260, n. 5115, p. 1796-1799, 1993.
- BRAIG, H. R.; GUZMAN, H.; TESH, R. B.; O'NEILL, S. L. Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart. **Nature**, v. 367, n. 6462, p. 453-455, 1994.
- BREEUWER, J. A. J.; WERREN, J. H. Cytoplasmic Incompatibility and bacterial density in *Nasonia vitripennis*. **Genetics**, v. 135, p. 565-574, 1993.
- BRELSFOARD, C. L.; DOBSON, S. L. *Wolbachia*-based strategies to control insect pests and disease vectors. **Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.**, v. 17, p. 55-63, 2009.

BROWNLIE, J. C.; CASS, B. N.; RIEGLER, M.; WITSENBURG, J. J.; ITURBE-ORMAETXE, I.; MCGRAW, E. A.; O'NEILL, S. L. Evidence for metabolic provisioning by a common invertebrate endosymbiont, *Wolbachia pipientis*, during periods of nutritional stress. **PLoS Pathog.**, v. 5, n. 4, p. e1000368, 2009.

BRUCKER, R. M.; BORDENSTEIN, S. R. Speciation by symbiosis. **Trends Ecol. Evol.**, v. 27, p. 443-451, 2012.

BUSH, G. L. The cytotaxonomy of the larvae of some Mexican fruit flies in the genus *Anastrepha*. **Psyche**, v. 68, n. 3, p. 87-101, 1962.

CÁCERES, C.; SEGURA, D. F.; VERA, M. T.; WORNOPYORN, V.; CLADERA, J. L.; TEAL, P.; SAPOUNTZIS, P.; BOURTZIS, P.; ZACHAROPOULOU, A.; ROBINSON, A. S. Incipient speciation revealed in *Anastrepha fraterculus* (Diptera; Tephritidae) by studies on mating compatibility, sex pheromones, hybridization, and cytology. **Biol. J. Linn. Soc.**, v. 97, p. 152-165, 2009.

CLARK, M. E.; VENETI, Z.; BOURTZIS, K.; KARR, T. L. The distribution and proliferation of the intracellular bacteria *Wolbachia* during spermatogenesis in *Drosophila*. **Mech. Develop.**, v. 111, n. 1-2, p. 3-15, 2002.

CLARK, M. E.; VENETI, Z.; BOURTZIS, K.; KARR, T. L. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility during sperm development: the cyst as the basic cellular unit of CI expression. **Mech. Develop.**, v. 120, n. 2, p. 185-198, 2003.

CONTE, C. A.; SEGURA, D. F.; MILLA, F. H.; AUGUSTINOS, A.; CLADERA, J. L.; BOURTZIS, K.; LANZAVECHIA, S. B. *Wolbachia* infection in Argentinean populations of *Anastrepha fraterculus* sp1: preliminary evidence of sex ratio distortion by one of two strains. **BMC microbiol.**, v. 19, n. 1, p. 1-17, 2019.

COSCRATO, V. E.; BRAZ, A. S.; PERONDINI, A. L.; SELIVON, D.; MARINO, C. L. *Wolbachia* in *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae). **Curr. Microbiol.**, v. 59, n. 3, p. 295-301, 2009.

DE OLIVEIRA, C. C.; MANFRIN, M. H.; SENE, F. M.; JACKSON, L. L.; ETGES, W. J. Variations on a theme: diversification of cuticular hydrocarbons in a clade of cactophilic *Drosophila*. **BMC Evol. Biol.**, v. 11, n. 1, p. 1-19, 2011.

DEDEINE, F.; VAVRE, F.; FLEURY, F.; LOPPIN, B.; HOCHBERG, M.E.; BOULETREAU, M. Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. **P. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, n. 11, p. 6247-6252, 2001.

DEVESCOVI, F.; ABRAHAM, S.; RORIZ, A. K. P.; NOLAZCO, N.; CASTAÑEDA, R.; TADEO, E.; CÁCERES, C.; SEGURA, D. F.; VERA, M. T.; JOACHIM-BRAVO, L.; CANAL, N.; RULL, J. Ongoing speciation within the *Anastrepha fraterculus* cryptic species complex: the case of the Andean morphotype. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 152, p. 238-247, 2014.

DEVESCOVI, F.; CONTE, C. A.; AUGUSTINOS, A.; MARTINEZ, E. I. C.; SEGURA, D. F.; CÁCERES, C.; LANZAVECHIA, S. B.; BOUTTZIS, K. Symbionts do not affect the

mating incompatibility between the Brazilian-1 and Peruvian morphotypes of the *Anastrepha fraterculus* cryptic species complex. **Sci. Rep.**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

DIAS, V. S.; SILVA, J. G.; LIMA, K. M.; PETITINGA, C. S. C. D.; HERNÁNDEZ-HORTIZ, V.; LAUMANN, R. A.; PARANHOS, B. J.; URAMOTO, K.; ZUCCHI, R. A.; JOACHIM-BRAVO, I. S. An integrative multidisciplinary approach to understanding cryptic divergence in Brazilian species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). **Biol. J. Linn. Soc.**, v. 117, p. 725-746, 2016.

DOBSON, S. L.; BOURTZIS, K.; BRAIG, H. R. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. **Insect Biochem. Molec.**, v. 29, n. 2, p. 153-160, 1999.

DOBSON, S. L.; MARSLAND, E. J.; RATTANADECHAKUL, W. Mutualistic *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus*: accelerating cytoplasmic drive. **Genetics**, v. 160, n. 3, p. 1087-1094, 2002.

DURON, O.; BOUREUX, A.; ECHAUBARD, P.; BERTHOMIEU, A.; BERTICAT, C.; FORT, P.; WEILL, M. Variability and expression of ankyrin domain genes in *Wolbachia* variants infecting the mosquito *Culex pipiens*. **J. Bacteriol.**, v. 189, n. 12, p. 4442-4448, 2007.

DYCK, V. A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S. (Eds.). **Sterile Insect Technique: principles and practice in area-wide integrated pest management**, Second Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 2021. 1216 pp.

EKESI, S.; BILLAH, M. K.; NDERITU, P. W.; LUX, S. A.; RWOMUSHANA, I. Evidence for competitive displacement of *Ceratitidis cosyra* by the invasive fruit fly *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae) on mango and mechanisms contributing to the displacement. **J. Econ. Entomol.**, v. 102, n. 3, p. 981-991, 2009.

ESTEVEZ, F. G. **Exometaboloma do tegumento da vespa social *Polybia paulista* por análises GC-MS: bases moleculares do reconhecimento de tipos parentais**. 91 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2014.

FAST, E. M.; TOOMEY, M. E.; PANARAM, K.; DESJARDINS, D.; KOLACZYK, E. D.; FRYDMAN, H. M. *Wolbachia* enhance *Drosophila* stem cell proliferation and target the germline stem cell niche. **Science**, v. 334, n. 6058, p. 990-992, 2011.

FRY, A. J.; RAND, D. M. *Wolbachia* interactions that determine *Drosophila melanogaster* survival. **Evolution**, v. 56, n. 10, p. 1976-1981, 2002.

GEMENO, C.; LASERNA, N.; RIBA, M.; VALLS, J.; CASTAÑÉ, C.; ALOMAR, O. Cuticular hydrocarbons discriminate cryptic *Macrolephus* species (Hemiptera: Miridae). **B. Entomol. Res.**, v. 102, n. 6, p. 624-631, 2012.

GHELELOVITCH, S. Sur le déterminisme génétique de la stérilité dans le croisement entre différentes souches de *Culex autogenicus* Roubaud. **CR Acad. Sci. Paris**, v. 24, p. 2386-2388, 1952.

- GLOWSKA, E.; DRAGUN-DAMIAN, A.; DABERT, M.; GERTH, M. New *Wolbachia* supergroups detected in quill mites (Acari: Syringophilidae). **Infect. Genet. Evol.**, v. 30, p. 140-146, 2015.
- GURUPRASAD, N. M.; MOUTON, L.; PUTTARAJU, H. P. Effect of antibiotic, temperature curing of *Wolbachia* and seasonal variation on the reproductive fitness of the Uzifly *Exorista sorbillans* (Diptera: Tachinidae). **Symbiosis**, v. 54, n. 3, p. 151-158, 2011.
- HARIRI, A. R.; WERREN, J. H.; WILKINSON, G. S. Distribution and reproductive effects of *Wolbachia* in stalk-eyed flies (Diptera: Diopsidae). **Heredity**, v. 81, p. 254-260, 1998.
- HARRIS, H. L.; BRAIG, H. R. Sperm chromatin remodelling and i-induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila*. **Biochem. Cell Biol.**, v. 81, p. 229-240, 2003.
- HAVERTY, M. I.; WOODROW, R. J.; NELSON, L. J.; GRACE, J. K. Cuticular hydrocarbons of termites of the Hawaiian Islands. **J. Chem. Ecol.**, v. 26, n. 5, p. 1167-1191, 2000.
- HEATH, B. D.; BUTCHER, R. D. J.; WHITFIELD, W. G. F.; HUBBARD, S. F. Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. **Curr. Biol.**, v. 9, n. 6, p. 313-316, 1999.
- HENDRICHS, J.; VERA, M. T.; DE MEYER, M.; CLARKE, A. K. Resolving cryptic species complexes of major Tephritid pests. **ZooKeys**, v. 540, p. 5-39, 2015.
- HERNÁNDEZ-ORTIZ, V.; GOMEZ-ANAYA, J. A.; SANCHEZ, A.; MCPHERON, B. A.; ALUJA, M. Morphometric analysis of Mexican and South American populations of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera:Tephritidae) and recognition of a distinct Mexican morphotype. **Bull. Entomol. Res.**, v. 94, p. 487-499, 2004.
- HERNÁNDEZ-ORTIZ, V.; BARTOLUCCI, A. F.; MORALES-VALLES, P.; FRÍAS, D.; SELIVON, D. Cryptic Species of the *Anastrepha fraterculus* Complex (Diptera: Tephritidae): a multivariate approach for the recognition of South American morphotypes. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 105, n. 2, p. 305-318, 2012.
- HERNÁNDEZ-ORTIZ, V.; CANAL, N. A.; TIGRERO-SALAS, J. O.; RUÍZ-HURTADO, F. M.; DZUL-CAUICH, J. F. Taxonomy and phenotypic relationships of the *Anastrepha fraterculus* complex in the Mesoamerican and Pacific Neotropical dominions (Diptera, Tephritidae). **ZooKeys**, v. 540, p. 95-124, 2015.
- HERTIG, M.; WOLBACH, S. B. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. **J. Med. Res.**, v. 44, n. 3, 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.
- HILGENBOECKER, K.; HAMMERSTEIN, P.; SCHLATTMANN, P.; TELSCHOW, A.; WERREN, J. H. How many species are infected with *Wolbachia*? - a statistical analysis of current data. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 281, n. 2, p. 215-220, 2008.

- HOFFMANN, A. A.; TURELLI, M.; SIMMONS, G. M. Unidirectional incompatibility between populations of *Drosophila simulans*. **Evolution**, v. 40, n. 4, p. 692-701, 1986.
- HURST, G. D. D.; SCHILTHUIZEN, M. Selfish genetic elements and speciation. **Heredity**, v. 80, n. 1, p. 2-8, 1998.
- JAENIKE, J.; DYER, K. A.; CORNISH, C.; MINHAS, M. S. Asymmetrical reinforcement and *Wolbachia* infection in *Drosophila*. **PLoS Biol.**, v. 4, n. 10, p. e325, 2006.
- JAMNONGLUK, W.; BAIMAI, V.; KITTAYAPONG, P. Molecular evolution of tephritid fruit flies in the genus *Bactrocera* based on the cytochrome oxidase I gene. **Genetica**, v. 119, n. 1, p. 19-25, 2003.
- JENNINGS, J. H.; ETGES, W. J.; SCHMITT, T.; HOIKKALA, A. Cuticular hydrocarbons of *Drosophila montana*: geographic variation, sexual dimorphism and potential roles as pheromones. **J. Insect Physiol.**, v. 61, p. 16-24, 2014.
- JEYAPRAKASH, A.; HOY, M. A. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. **Insect Mol. Biol.**, v. 9, n. 4, p. 393-405, 2000.
- JIGGING, F. M.; BENTLEY, J. K.; MAJERUS, M. E. N.; HURST, G. D. D. How many species are infected with *Wolbachia*? Cryptic sex ratio distorters revealed to be common by intensive sampling. **P. Roy. Soc. Lond. B**, v. 268, p. 1123-1126, 2001.
- JOWETT, T. Preparation of nucleic acids. In: ROBERTS, D. B. (Ed.). **Drosophila: a practical approach**. Oxford: IRL Press Limited. 1986. p. 275-286.
- KARIMI, J.; DARSOUEI, R. Presence of the endosymbiont *Wolbachia* among some fruit flies (Diptera: Tephritidae) from Iran: a multilocus sequence typing approach. **J. Asia-Pac. Entomol.**, v. 17, n. 1, p. 105-112, 2014.
- KATHER, R.; MARTIN, S. J. Evolution of cuticular hydrocarbons in the hymenoptera: a meta-analysis. **J. Chem. Ecol.**, v. 41, n. 10, p. 871-883, 2015.
- KENT, B. N.; BORDENSTEIN, S. R. Phage WO of *Wolbachia*: lambda of the endosymbiont world. **Trends Microbiol.**, v. 18, n. 4, p. 173-181, 2010.
- KITTAYAPONG, P.; MILNE, J. R.; TIGVATTANANONT, S.; BAIMAI, V. Distribution of the reproduction-modifying bacteria, *Wolbachia*, in natural populations of tephritid fruit flies in Thailand. **Science Asia**, v. 26, p. 93-103, 2000.
- KOYAMA, J.; KAKINOHANA, H.; MIYATAKE, T. Eradication of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, in Japan: Importance of behavior, ecology, genetics, and evolution. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 49, p. 331-349, 2004.
- KYRITSIS, G. A.; AUGUSTINOS, A. A.; LIVADARAS, I.; CÁCERES, C.; BOURTZIS, K.; PAPADOPOULOS, N. T. Medfly-*Wolbachia* symbiosis: genotype x genotype interactions determine host's life history traits under mass rearing conditions. **BMC Biotechnol.**, v. 19, n. 2, p. 1-15, 2019.

LANDMANN, F.; ORSI, G. A.; LOPPIN, B.; SULLIVAN, W. *Wolbachia*-mediated cytoplasmic incompatibility is associated with impaired histone deposition in the male pronucleus. **PLoS Pathog.**, v. 5, n. 3, p. e1000343, 2009.

LASSY, C. W.; KARR, T. L. Cytological analysis of fertilization and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. **Mech. Develop.**, v. 57, n. 1, p. 47-58, 1996.

LAVEN, H. Crossing experiments with *Culex* strains. **Evolution**, v. 5, p. 370-375, 1951.

LAVEN, H. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. **Nature**, v. 216, p. 383-384, 1967.

LAVEN, H. Speciation by cytoplasmic isolation in the *Culex pipiens*-complex. **Cold Spring Harb. Sym.**, v. 24 p. 166-173, 1959.

LE CLEC'H, W.; CHEVALIER, F. D.; GENTY, L.; BERTAUX, J.; BOUCHON, D.; SICARD, M. Cannibalism and predation as paths for horizontal passage of *Wolbachia* between terrestrial isopods. **PloS One**, v. 8, n. 4, p. e60232, 2013.

LEFOULON, E.; BAIN, O.; MAKEPEACE, B. L.; D'HAESE, C.; UNI, S.; MARTIN, C.; GAVOTTE, L. Breakdown of coevolution between symbiotic bacteria *Wolbachia* and their filarial hosts. **PeerJ**, v. 4, p. e1840, 2016.

LEFOULON, E.; CLARK, T.; BORVETO, F.; PERRIAT-SANGUINET, M.; MOULIA, C.; SLATKO, B. E.; GAVOTTE, L. Pseudoscorpion *Wolbachia* symbionts: diversity and evidence for a new supergroup S. **BMC Microbiol.**, v. 20, n. 1, p. 1-15, 2020.

LI, S. J.; AHMED, M. Z.; LV, N.; SHI, P. Q.; WANG, X. M.; HUANG, J. L.; QIU, B. L. Plant-mediated horizontal transmission of *Wolbachia* between whiteflies. **ISME J.**, v. 11, n. 4, p. 1019-1028, 2017.

LIMA, I. S.; HOUSEB, P. E.; DO NASCIMENTO, R. R. Volatile substances from male *Anastrepha fraterculus* Wied. (Diptera: Tephritidae): identification and behavioural activity. **J. Brazil. Chem. Soc.**, v. 12, p. 196-201, 2001.

LO, N.; PARASKEVOPOULOS, C.; BOURTZIS, K.; O'NEILL, S. L.; WERREN, J. H.; BORDENSTEIN, S. R.; BANDI, C. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. **Int. J. Syst Evol. Micr.**, v. 57, n. 3, p. 654-657, 2007.

LV, N.; PENG, J.; CHEN, X. Y.; GUO, C. F.; SANG, W.; WANG, X. M.; AHMED, M. Z.; XU, Y. Y.; QIU, B. L. Antagonistic interaction between male-killing and cytoplasmic incompatibility induced by *Cardinium* and *Wolbachia* in the whitefly, *Bemisia tabaci*. **Insect Sci.**, v. 28, n. 2, p. 330-346, 2021.

MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A.; SUGAYAMA, R. L. Biogeografia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas das frutas de interesse econômico no Brasil**: conhecimento básico e aplicado. Holos, Ribeirão Preto, Brasil, 2000. p. 93-98.

- MANNI, M.; LIMA, K. M.; GUGLIELMINO, C. R.; LANZAVECCHIA, S. B.; JURI, M.; VERA, T.; CLADERA, J.; SCOLARI, F.; GOMULSKI, L.; BONIZZONI, M.; GASPERI, G.; SILVA, J. G.; MALACRIDA, A. R. Relevant genetic differentiation among Brazilian populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae). **ZooKeys**, n. 540, p. 157- 173, 2015.
- MARCON, H. S., COSCRATO, V. E., SELIVON, D., PERONDINI, A. L. P., & MARINO, C. L. Variations in the sensitivity of different primers for detecting *Wolbachia* in *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). **Braz. J. Microbiol.**, v. 42, n. 2, p. 778-785, 2011.
- MARTINEZ, H.; TOLEDO, J.; LIEDO, P.; MATEOS, M. Survey of heritable endosymbionts in Southern Mexico populations of the fruit fly species *Anastrepha striata*. **Curr. Microbiol.**, v. 65, p. 711-718, 2012.
- MASCARENHAS, R. O.; PREZOTTO, L. F.; PERONDINI, A. L. P.; MARINO, C. L.; SELIVON, D. *Wolbachia* in guilds of *Anastrepha* fruit flies (Thripidae) and parasitoid wasp (Braconidae). **Genet. Mol. Biol.**, v. 39, n. 4, p. 600-610, 2016.
- MCPHERON, B. A.; HAN, H. Y.; SILVA, J. G.; NORRBOM, A. L.; ALUJA, M.; NORRBOM, A. Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based upon 16S rRNA mitochondrial DNA. In: ALUJA, M.; NORRBOM, A. (Eds.). **Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior**. CRC Press, Boca Raton, FL, 1999. p. 343-362.
- MENDES, L. O. T. Observações citológicas em moscas das frutas. **Bragantia**, v. 17, p. 29-39, 1958.
- MILLER, W. J.; EHRMAN, L.; SCHNEIDER, D. Infectious speciation revisited: impact of symbiont-depletion on female fitness and mating behavior of *Drosophila paulistorum*. **PLoS Pathog.**, v. 6, n. 12, p. e1001214, 2010.
- MORGANTE, J. S.; MALAVASI, A.; BUSH, G. L. Biochemical systematics and evolutionary relationships of neotropical *Anastrepha*. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 73, p. 622-630, 1980.
- MORROW, J. L.; FROMMER, M.; SHEARMAN, D. C. A.; RIEGLER, M. Tropical tephritid fruit fly community with high incidence of shared *Wolbachia* strains as platform for horizontal transmission of endosymbionts. **Environ. Microbiol.**, v. 16, n. 12, p. 3622-3637, 2014.
- MORROW, J. L.; FROMMER, M.; ROYER, J. E.; SHEARMAN, D. C.; RIEGLER, M. *Wolbachia* pseudogenes and low prevalence infections in tropical but not temperate Australian tephritid fruit flies: manifestations of lateral gene transfer and endosymbiont spillover? **BMC Evol. Biol.**, v. 15, n. 1, p. 1-16, 2015.
- NASCIMENTO, A. S.; MALAVASI, A.; MORGANTE, J. S.; DUARTE, A. L. Hot-water immersion treatment for mangoes infested with *Anastrepha fraterculus*, *A. obliqua*, and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Brazil. **J. Econ. Entomol.**, v. 85, p. 456-460, 1992.

NGUYEN, D. T.; MORROW, J. L.; SPOONER-HART, R. N.; RIEGLER, M. Independent cytoplasmic incompatibility induced by *Cardinium* and *Wolbachia* maintains endosymbiont coinfections in haplodiploid thrips populations. **Evolution**, v. 71, n. 4, p. 995-1008, 2017.

NIKOH, N.; HOSOKAWA, T.; MORIYAMA, M.; OSHIMA, K.; HATTORI, M.; FUKATSU, T. Evolutionary origin of insect-*Wolbachia* nutritional mutualism. **P. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 111, n. 28, p. 10257-10262, 2014.

NORRBOM, A. L.; KORYTKOWSKI, C. A.; ZUCCHI, R. A.; URAMOTO, K.; VENABLE, G. L.; MCCORMICK, J.; DALLWITZ, M. J. *Anastrepha* and *Toxotrypana*: descriptions, illustrations, and interactive keys. **DELTA-Description Language for Taxonomy**. <http://delta-intkey.com/anatox>, 2012.

O'NEILL, S. L.; GIORDANO, R.; COLBERT, A. M.; KARR, T. L.; ROBERTSON, H. M. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. **P. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, n. 7, p. 2699-2702, 1992.

O'NEIL, S. L.; HOFFMANN, A. A.; WERREN, J. H. **Influential passengers**: inherited microorganisms and arthropod reproduction. Oxford University Press, New York, USA, 1997. 214 p.

PARASKEVOPOULOS, C.; BORDENSTEIN, S. R.; WERNEGREEN, J. J.; WERREN, J. H.; BOURTZIS, K. Toward a *Wolbachia* multilocus sequence typing system: discrimination of *Wolbachia* strains present in *Drosophila* species. **Curr. Microbiol.**, v. 53, n. 5, p. 388-395, 2006.

PERLMUTTER, J. I.; BORDENSTEIN, S. R.; UNCKLESS, R. L.; LEPAGE, D. P.; METCALF, J. A.; HILL, T.; MARTINEZ, J.; JIGGINS, F. M.; BORDENSTEIN, S. R. The phage gene *wmk* is a candidate for male killing by a bacterial endosymbiont. **PLoS Pathog.**, v. 15, n. 9, p. e1007936, 2019.

POINSOT, D.; BOURTZIS, K.; GEORGE MARKAKIS, G.; SAVAKIS, C.; MERÇOT, H. *Wolbachia* Transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: Host Effect and Cytoplasmic Incompatibility Relationships. **Genetics**, v. 150, p. 227-237, 1998.

PONTIER, S. M.; SCHWEISGUTH, F. A *Wolbachia*-sensitive communication between male and female pupae controls gamete compatibility in *Drosophila*. **Curr. Biol.**, v. 25, p. 2339-2348, 2015.

PREZOTTO, L. F. **Tipificação de linhagens de *Wolbachia* do complexo *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) da região neotropical por análise de locos múltiplos**. 102 p. Tese de Doutorado - Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

PREZOTTO, L. F.; PERONDINI, A. L.; HERNÁNDEZ-ORTIZ, V.; MARINO, C. L.; SELIVON, D. *Wolbachia* strains in cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae) along the Neotropical Region. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 40, n. 1, p. 59-67, 2017.

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

RENDÓN, P.; ENKERLIN, W. Area-wide fruit fly programmes in latin america. In: HENDRICH, J.; PEREIRA, R.; VREYSEN, M. J. B. (Eds.). **Area-wide Integrated Pest Management: Development and Field Application**. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 2021. p. 161-195.

RIBEIRO, R. M. **Wolbachia e incompatibilidade citoplasmática em *Anastrepha* sp.1 aff. *fraterculus* e *A. obliqua* (Diptera: Tephritidae)**. 52 p. Dissertação de Mestrado - Depto de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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

RIPARBELLI, M. G.; GIORDANO, R.; CALLAINI, G. Effects of *Wolbachia* on sperm maturation and architecture in *Drosophila simulans* Riverside. **Mech. Develop.**, v. 124, n. 9-10, p. 699-714, 2007.

ROESSLER, Y. Insecticidal bait and cover sprays. In: ROBINSON, A. S.; HOOPER, G. (Ed.). **Fruit flies: their biology, natural enemies and control**. World Crop Pests. Elsevier, Amsterdam. 1989. p. 329-336.

RORIZ, A. K. P.; JAPYASSÚ, H. F.; JOACHIM-BRAVO, I. S. Incipient speciation in the *Anastrepha fraterculus* cryptic species complex: reproductive compatibility between *A. sp. 1 aff. fraterculus* and *A. sp. 3 aff. fraterculus*. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 162, n. 3, p. 346-357, 2017.

RULL, J.; ABRAHAM, S.; KOVALESKI, A.; SEGURA, D. F.; ISLAM, A.; WORNOPYORN, V.; DAMMALAGE, T.; TOMAS, U. S.; VERA, M. T. Random mating and reproductive compatibility among Argentinean and southern Brazilian populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **B. Entomol. Res.**, v. 102, n. 4, p. 435, 2012.

RULL, J.; ABRAHAM, S.; KOVALESKI, A.; SEGURA, D. F.; MENDOZA, M.; LIENDO, M.; VERA, M. T. Evolution of pre-zygotic and post-zygotic barriers to gene flow among three cryptic species within the *Anastrepha fraterculus* complex. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 148, p. 213-222, 2013.

SANTOS, P. **Variabilidade do DNA mitocondrial em populações de três espécies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae)**. 1994. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

SARIDAKI, A.; BOURTZIS, K. *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 13, n. 1, p. 67-72, 2010.

SCHOLZ, M.; ALBANESE, D.; TUOHY, K.; DONATI, C.; SEGATA, N.; ROTA-STABELLI, O. Large scale genome reconstructions illuminate *Wolbachia* evolution. **Nat. Commun.**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2020.

SCOTT, M. J.; BENEDICT, M. Q. Concept and history of genetic control. In: ADELMAN, Z. N. (Ed.). **Genetic Control of Malaria and Dengue**. Academic Press, 2016. p. 31-54.

SEGURA, D. E.; VERA, M. T.; RULL, J.; WORNOAYPONG, V.; ISLAM, A.; ROBINSON, A. S. Assortative mating among *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) hybrids from two distinct populations as a possible route to radiation of the *fraterculus* cryptic species group. **Biol. J. Linn. Soc.**, v. 102, p. 346-354, 2011.

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

SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P. Eggshell morphology in two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 91, p. 473-478, 1998.

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

SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P.; MORGANTE, J. S. Haldane's rule and other aspects of reproductive isolation observed in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). **Genet. Mol. Biol.**, v. 22, p. 507-510, 1999.

SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P.; RIBEIRO, A. F.; MARINO, C. L.; LIMA, M. M. A.; COSCRATO, V. E. *Wolbachia* endosymbiont in a species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). **Int. J. Inver. Rep. Dev.**, v. 42, p. 121-127, 2002.

SELIVON, D.; VRETOS, C.; FONTES, L.; PERONDINI, A. L. P. New variant forms in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). In: BARNES, B. N. (Ed.). **Proceedings 6th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance**. Isteq Scientific Publications, Stellenbosch, South Africa, 2004. p. 253-258.

SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P. Especies crípticas del complejo *Anastrepha fraterculus* en Brasil. In: S y G (Eds). **Moscas de las frutas en Latinoamérica (Diptera: Tephritidae): Diversidad, biología y manejo**. México, DF, p. 101-117, 2007.

SILVA, J. G.; BARR, N. B. **Recent advances in molecular systematics of *Anastrepha Schiner***. 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, Salvador, Brazil, 2006. p. 13-28.

SHOEMAKER, D. D.; KATJU, V.; JAENIKE, J. *Wolbachia* and the evolution of reproductive isolation between *Drosophila recens* and *Drosophila subquinaria*. **Evolution**, v. 53, p. 1157-1164, 1999.

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

SHROPSHIRE, J. D.; BORDENSTEIN, S. R. Speciation by symbiosis: the microbiome and behavior. **MBio**, v. 7, n. 2, 2016.

SMITH-CALDAS, M. R. B.; MCPHERON, B. A.; SILVA, J. G.; ZUCCHI, R. A. Phylogenetic relationships among species of the fraterculus group (Anastrepha: Diptera: Tephritidae) inferred from DNA sequences of mitochondrial Cytochrome Oxidase I. **Neotrop. Entomol.**, v. 30, p. 565-573, 2001.

SNOOK, R. R.; CLELAND, S. Y.; WOLFNER, M. F.; KARR, T. L. Offsetting effects of *Wolbachia* infection and heat shock on sperm production in *Drosophila simulans*: analyses of fecundity, fertility and accessory gland proteins. **Genetics**, v. 155, p. 167-178, 2000.

SOLFERINI, V. N.; MORGANTE, J. S. Karyotype study of eight species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). **Carylogia**, v. 40, p. 229-241, 1987.

STECK, G. J. Biochemical systematics and population genetic structure of *Anastrepha fraterculus* and related species (Diptera: Tephritidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 84, p. 10-28, 1991.

STECK, G. J.; SHEPPARD, W. S. Mitochondrial DNA variation in *Anastrepha fraterculus*. In: ALUJA, M.; LIEDO, P. (Ed.). **Fruit flies: biology and management**. Springer, New York, 1993. p. 9-14.

STONE, A. The fruit flies of the genus *Anastrepha*. **U. S. Dept. Agri. Misc. Public.**, v. 439, p. 1-112, 1942.

STOUTHAMER, R.; BREWER, J. A. J.; HURST, G. D. D. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 53, p. 71-102, 1999.

TRAM, U.; SULLIVAN, W. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. **Science**, v. 296, n. 5570, p. 1124-1126, 2002.

TRAM, U.; FERREE, P. M.; SULLIVAN, W. Identification of *Wolbachia*-host interacting factors through cytological analysis. **Microbes Infect.**, v. 5, p. 999-1011, 2003.

TURELLI, M. Evolution of incompatibility-inducing microbes and their hosts. **Evolution**, v. 48, n. 5, p. 1500-1513, 1994.

VANDEKERCKHOVE, T. T. M.; WATTEYNE, S.; WILLEMS, A.; SWINGS, J. G.; MERTENS, J.; GILLIS, M. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the cytoplasmic bacterium *Wolbachia* from the novel host *Folsomia candida* (Hexapoda, Collembola) and its implications for wolbachial taxonomy. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 180, n. 2, p. 279-286, 1999.

VANIČKOVÁ, L.; SVATOŠ, A.; KROISS, J.; KALTENPOTH, K.; DO NASCIMENTO, R. R.; HOSKOVEC, M.; BŘÍZOVÁ, R.; KALINOVÁ, B. Cuticular hydrocarbons of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus*: variability with sex and age. **J. Chem. Ecol.**, v. 38, n. 9, p. 1133-1142, 2012.

- VANÍČKOVÁ, L.; VIRGILIO, M.; TOMČALA, A.; BŘÍZOVÁ, R.; EKESI, S.; HOSKOVEC, M.; KALINOVÁ, B.; DO NASCIMENTO, R. R.; DE MEYER, M. Resolution of three cryptic agricultural pests (*Ceratitis fasciventris*, *C. anonae*, *C. rosa*, Diptera: Tephritidae) using cuticular hydrocarbon profiling. **B. Entomol. Res.**, v. 104, n. 5, p. 631-638, 2014.
- VANÍČKOVÁ, L.; BŘÍZOVÁ, R.; MENDONÇA, A. L.; POMPEIANO, A.; DO NASCIMENTO, R. R. Intraspecific variation of cuticular hydrocarbon profiles in the *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) species complex. **J. Appl. Entomol.**, v. 139, p. 679-689, 2015b.
- VANÍČKOVÁ, L.; HERNÁNDEZ-ORTIZ, V.; BRAVO, I. S. J.; DIAS, V.; RORIZ, A. K. P.; LAUMANN, R. A.; MENDONÇA, A. L.; PARANHOS, B. A. J.; NASCIMENTO, R. R. Current knowledge of the species complex *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae) in Brazil. **ZooKeys**, v. 540, p. 211-237, 2015a.
- VARGAS, R. I.; LONG, J.; MILLER, N. W.; DELATE, K.; JACKSON, C. G.; UCHIDA, G. K.; BAUTISTA, R. C.; HARRIS, E. J. Releases of *Psytalia fletcheri* (Hymenoptera: Braconidae) and sterile flies to suppress melon fly (Diptera: Tephritidae) in Hawaii. **J. Econ. Entomol.**, v. 97, p. 1531-1539, 2004.
- VERA, M. T.; CÁCERES, C.; WORNOPYORN, V.; ISLAM, A.; ROBINSON, A. S.; DE LA VEGA, M. H.; HENDRICH, J.; CAYOL, J. P. Mating incompatibility among populations of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 99, p. 387-397, 2006.
- WALKER, T.; JOHNSON, P. H.; MOREIRA, L. A.; ITURBE-ORMAETXE, I.; FRENTIU, F. D.; MCMENIMAN, C. J. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. **Nature**, v. 476, p. 450-455, 2011.
- WANG, G. H.; JIA, L. Y.; XIAO, J. H.; HUANG, D. W. Discovery of a new *Wolbachia* supergroup in cave spider species and the lateral transfer of phage WO among distant hosts. **Infect. Genet. Evol.**, v. 41, p. 1-7, 2016.
- WEINERT, L. A.; ARAUJO-JNR, E. V.; AHMED, M. Z.; WELCH, J. J. The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. **P. Roy. Soc. B-Biol. Sci.**, v. 282, n. 1807, p. 20150249, 2015.
- WERREN, J. H. Biology of *Wolbachia*. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 42, p. 587-609, 1997.
- WERREN, J. H.; BALDO, L.; CLARK, M. E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 6, n. 10, p. 741-751, 2008.
- WERREN, J. H.; WINDSOR, D. M. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? **P. Roy. Soc. Lond. B Bio.**, v. 267, p. 1127-1285, 2000.
- WERREN, J. H.; WINDSOR, D.; GUO, L. R. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. **P. Roy. Soc. Lond. B Bio.**, v. 262, p. 197-204, 1995.

WERREN, J. H.; BALDO, L.; CLARK, M. E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, n. 10, p. 741-751, 2008.

WHITE, I. M.; ELSON-HARRIS, M. **Fruit flies of economic significance**: their identification and bionomics. International Institute of Entomology, London, 1992. 600 p.

XI, Z.; JOSHI, D. Genetic control of malaria and dengue using *Wolbachia*. In: ADELMAN Z. N. (Ed.). **Genetic control of malaria and dengue**. Academic Press, London, UK. 2016. p. 305-333.

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

ZABALOU, S.; APOSTOLAKI, A.; LIVADARAS, I.; FRANZ, G.; ROBINSON, A. S.; SAVAKIS, C.; BOURTZIS, K. Incompatible insect technique: incompatible males from a *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) genetic sexing strain. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 132, p. 232-240, 2009.

ZABALOU, S.; RIEGLER, M.; THEODORAKOPOULOU, M.; STAUFFER, C.; SAVAKIS, C.; BOURTZIS, K. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. **PNAS**, v. 101, p. 15042-15045, 2004.

ZHOU, W.; ROUSSET, F.; O'NEILL, S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. **P. Roy. Soc. Lond. B Bio.**, v. 265, p. 509-515, 1998.

ZUCCHI, R. A. 2008. **Fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Brazil**: *Anastrepha* species and their hosts plants and parasitoids. Disponível em: <http://www.lea.esalq.usp.br/anastrepha/edita_ssp_i.php>. Acesso em: 15 abr. 2021.