

Universidade Federal do Amapá – UNIFAP

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical – PPGBIO

Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá – IEPA

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA-AP

Conservação Internacional do Brasil – CI-BRASIL

DANILO BAIA DO NASCIMENTO

Estudos moleculares de populações de *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835) (Diptera: Tephritidae) no estado do Amapá e efeitos biométricos de frutos de Taperebá (*Spondias mombin* L.) sobre os índices de infestação e parasitismo

MACAPÁ-AP

2012

DANILO BAIA DO NASCIMENTO

Estudos moleculares de populações de *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835) (Diptera: Tephritidae) no estado do Amapá e efeitos biométricos de frutos de Taperebá (*Spondias mombin* L.) sobre os índices de infestação e parasitismo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical, área de concentração em Ecologia e Meio Ambiente.

Orientador: Dr. Ricardo Adaime

Co-orientadora: Dr^a. Janisete Gomes Silva

MACAPÁ-AP

2012

DANILO BAIA DO NASCIMENTO

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Adaime (EMBRAPA)

1º Examinador: Prof. Dr. Gilberto Ken-Iti Yokomizo (EMBRAPA)

2º Examinador: Dr^a. Cristiane Ramos de Jesus Barros (EMBRAPA)

3º Examinador: Prof. Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto (UNIFAP)

Macapá-AP, 22 de junho de 2012

AGRADECIMENTOS

À minha mãe por tudo o que fez e ainda faz por mim;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical pela minha formação;

Aos amigos, colegas e companheiros de trabalho pelo auxílio nas pesquisas, companheirismo e preciosas sugestões;

Ao meu orientador Ricardo Adaime e à minha co-orientadora Janisete Gomes Silva pela enorme contribuição para a realização deste manuscrito;

À toda minha família pelo incentivo aos meus estudos;

Aos colegas do Laboratório de Entomologia da Embrapa Amapá pelo companheirismo e alegrias naquele ambiente de trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela bolsa de mestrado concedida;

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1 - Comportamento das variáveis biométricas dos frutos de taperebá: a) comprimento (mm) x peso (g), b) largura (mm) x peso (g) e c) largura (mm) x comprimento (mm). 26

Figura 2 - Infestação de moscas-das-frutas em relação ao comprimento (a), largura (b) e peso (c) dos frutos de taperebá. Na escala das abscissas 0.0 significa ausência de infestação e 1.0 significa presença. 28

Figura 3 – Parasitismo de moscas-das-frutas em relação ao comprimento (a), diâmetro (b) e peso (c) dos frutos de taperebá. Na escala das abscissas 0,0 significa ausência de parasitismo e 1.0 significa presença. 30

Figura 4 – Análise de clusters em relação às características biométricas, parasitismo e infestação dos frutos de taperebá. a) O BIC é o indicador da melhor escolha do modelo (EEV e VEV). b) incertezas ou probabilidade associada ao quanto é provável que aquele objeto faz parte daquele cluster que o método indicou. 32

Capítulo 2

Figura 1 - Mapa do Estado do Amapá com os pontos de coleta de exemplares de *A. obliqua*. Os 10 municípios onde foram feitas as coletas estão representados pelos pontos (Adaptado de IBGE, 2011). 46

Figura 2 - Reconstrução filogenética de *A. obliqua* baseada na região do genoma mitocondrial (COI) utilizando método Neighbor-Joining (NJ) e distância Kimura-2 Parâmetros. 52

Figura 3 - Haplótipos das 74 sequências de populações de *A. obliqua* obtidas de 10 municípios do estado do Amapá. 56

Figura 4 - Rede de haplótipos baseada na região mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI). Os haplótipos amostrados estão indicados por círculos coloridos e os 57

haplótipos não amostrados estão representados por pequenos pontos vermelhos. Os haplótipos foram coloridos de acordo com os diferentes municípios: Macapá (MCP), Cutias do Araguari (CUT), Santana (STN), Serra do Navio (SNV), Porto Grande (PG), Tartarugalzinho (TART), Ferreira Gomes (FG), Pracuúba (PRAC), Pedra Branca do Amapari (PB) e Calçoene (CAL).

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 - Características físicas dos frutos coletados, indicação de infestados e/ou parasitados. 22

Tabela 2 - Espécies de parasitoides de moscas-das-frutas e seus respectivos hospedeiros. 24

Tabela 3- Análise descritiva das características biométricas dos frutos de taperebá. 25

Capítulo 2

Tabela 1 - Locais de coleta de exemplares de *A. obliqua* com as coordenadas geográficas, número de amostras coletadas e número de amostras sequenciadas. 47

Tabela 2 - Frequência e distribuição de haplótipos mitocondriais para cada local de coleta com seus respectivos códigos (MCP-Macapá; STN-Santana; SNV-Serra do Navio; PG- Porto Grande; TAR-Tartarugalzinho; FG-Ferreira Gomes; CUT-Cutias do Araguari; PRAC-Pracuúba; PB-Pedra Branca do Amapari; CAL-Calçoene). 55

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO 1 Efeitos biométricos de frutos de Taperebá (<i>Spondias mombin</i> L.) sobre os índices de infestação por <i>Anastrepha obliqua</i> (Macquart, 1835) (Diptera: Tephritidae) e parasitismo	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1 INTRODUÇÃO	18
2 MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1 Local e Período de Coleta	20
2.2 Métodos Estatísticos de Análise	21
3 RESULTADOS	24
3.1 Caracterização Biométrica dos Frutos	25
3.2 Infestação	27
3.3 Parasitismo	29
4 DISCUSSÃO	33
5 CONCLUSÕES	35
AGRADECIMENTOS	35
REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO 2 Estudos moleculares de populações de <i>Anastrepha obliqua</i> (Macquart, 1835) (Diptera: Tephritidae) no estado do Amapá.	40
RESUMO	41
ABSTRACT	42
1 INTRODUÇÃO	43
2 MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1 Obtenção dos Exemplares de <i>Anastrepha obliqua</i>	45
2.2 Extração de DNA	47

2.3 Amplificação do fragmento do gene mitocondrial que codifica para a subunidade I da citocromo oxidase (COI)	47
2.4 Reação de Purificação dos Fragmentos Amplificados	49
2.5 Sequenciamento	49
2.6 Análise dos Dados	50
3 RESULTADOS	51
3.1 Análise Filogenética	51
3.2 Análise Haplotípica	54
4 DISCUSSÃO	58
5 CONCLUSÕES	60
AGRADECIMENTOS	61
REFERÊNCIAS	62

INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de frutas. Esta atividade econômica é de grande importância para o País, que em 2007 exportou 842 mil toneladas de frutas frescas, 15% a mais que no ano anterior (IBRAF, 2007). Na Amazônia brasileira, este segmento ocupa o quarto lugar em importância econômica, depois do minério de ferro, da madeira e da pecuária. Entretanto, do ponto de vista social, é a atividade que apresenta o maior potencial de distribuição de renda para a população, por envolver milhares de pequenos produtores, além das indústrias processadoras, garantindo a fixação do homem no campo, geração de empregos e bem-estar social (BASA, 2008).

Apesar do volume de exportação de frutas brasileiras ter aumentado nos últimos anos e a fruticultura ser considerada uma atividade promissora do ponto de vista econômico, social e ecológico, o país enfrenta problemas fitossanitários que afetam as exportações, destacando-se os insetos frugívoros de importância econômica e quarentenária nas áreas cultivadas. Estes são considerados uma das principais barreiras a serem vencidas, pois mesmo a fruticultura tendo qualidade e potencial produtivo, os países importadores restringem ao máximo a comercialização por meio de medidas quarentenárias rigorosas (SOUZA-FILHO, 2006).

As infestações de diversas espécies de frutos por Tephritidae têm ocorrido no mundo todo, apesar dos procedimentos de quarentena adotados por vários países (DUYCK et al., 2004). Na atualidade as moscas-das-frutas constituem um dos maiores grupos de insetos fitófagos com importância econômica mundial. Ocorrem desde a região temperada até a tropical, com exceção das áreas árticas e desérticas, onde a vida vegetal é escassa (ZUCCHI, 2001). Algumas espécies são mais agressivas devido à sua

alta capacidade colonizadora e outras têm distribuição restrita e baixa capacidade de adaptar-se a novos ambientes (MALAVASI, 2001).

As moscas-das-frutas pertencem à Ordem Diptera, Subordem Brachycera e Superfamília Tephritoidea (WHITE & ELSON-HARRIS, 1992; GALLO et al., 2002). As espécies de importância econômica estão associadas às famílias Tephritidae e Lonchaeidae.

A família Tephritidae apresenta 4.448 espécies agrupadas em 484 gêneros (NORRBON, 2004). O número atual de espécies deve ser superior ao mencionado, devido ao fato de existirem espécies em processo de descrição e novos registros de espécies e hospedeiros coletados, cujos dados ainda não foram publicados (ZUCCHI, 2007). Somente seis destes gêneros são de importância econômica: *Anastrepha* Schiner, *Bactrocera* Macquart, *Ceratitidis* MacLeay, *Rhagoletis* Loew, *Dacus* Hendel e *Toxotrypana* Gerstaecker.

O gênero *Anastrepha* Schiner é considerado o mais diverso e o de maior importância econômica para as Américas. É endêmico do novo mundo e restrito a ambientes tropicais e subtropicais, sendo atualmente composto por 250 espécies, incluídas em 18 grupos (NORRBOM; KORYTKOWSKI, 2009; 2011). No Brasil, 102 espécies já foram assinaladas, sendo seis particularmente importantes do ponto de vista econômico: *Anastrepha striata* (Schiner), *Anastrepha obliqua* (Macquart), *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann), *Anastrepha grandis* (Macquart), *Anastrepha pseudoparallela* (Loew) e *Anastrepha zenildae* Zucchi (URAMOTO; ZUCCHI, 2009).

O ciclo de vida das moscas-das-frutas ocorre em três ambientes: vegetação, fruto e solo. Os adultos habitam a planta hospedeira ou plantas vizinhas, onde passam a maior parte do tempo (MALAVASI; BARROS, 1988). A oviposição é feita em frutos na fase de amadurecimento, maduros e caídos no solo, no início do processo de decomposição.

Fatores ambientais como temperatura, luminosidade, forma, tamanho e características da superfície dos frutos, influenciam o processo de oviposição. Para localizar corretamente o fruto, a fêmea utiliza estímulos visuais e olfativos detectados por estruturas localizadas nas antenas, tarsos, probóscide e ovipositor (MORGANTE, 1991).

A fêmea percorre toda a superfície do fruto, tocando-o com a parte anterior da cabeça, o labelo e o sintergosternito 7 (bainha do ovipositor). Nessa etapa, a mosca analisa as características físicas (tamanho e formato) e químicas do fruto, em seguida ela insere o acúleo na polpa do fruto, posteriormente, deposita seus ovos no fruto de onde eclodem as larvas que se desenvolvem se alimentando da polpa. Ao final do terceiro ínstar, as larvas enterram-se no solo para transformar-se em pupas. Neste local ocorre a metamorfose e os imagos emergem dos pupários e reiniciam um novo ciclo. A emergência ocorre geralmente nas primeiras horas do dia e logo após os adultos procuram alimento (MORGANTE, 1991). As diferentes espécies de moscas-das-frutas alimentam-se na fase imatura tanto de frutos de plantas cultivadas como silvestres. Os adultos alimentam-se basicamente de néctar, sucos de frutos, seiva, pólen, fezes de pássaros e outros alimentos encontrados na superfície de folhas e frutos (CHRISTENSON; FOOTE, 1960; BATEMAN, 1972).

REFERÊNCIAS

BASA. **O Banco da Amazônia e o financiamento da fruticultura regional**. Contexto Amazônico. v:1, n.5. 2008. Disponível em <http://www.bancoamazonia.com.br/bancoamazonia2/includes%5Cinstitucional%5Carquivos%5Cbiblioteca%5Ccontextoamazonico%5Ccontexto_amazonico_5.pdf>. Acesso em 25 de abril de 2012.

BATEMAN, M.A. The ecology of fruit flies. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.17, p.493-518. 1972.

CHRISTENSON, L.D.; FOOTE, R.H. Biology of fruit flies. **Annual Review of Entomology**. v.5, p.171-192. 1960.

DUYCK, P.F.; DAVID, P.; QUILICI, S.) A review of relationships between interspecific (Diptera: Tephritidae). **Ecological Entomology**. v.29, p.511–520. 2004.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

IBRAF. **Instituto Brasileiro de Frutas**. 2007. Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/php?id=5961>. Acesso em 23 de Abril de 2012.

MALAVASI, A. Mosca-da-carambola, *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae). In: VILELA, E.F.; ZUCCHI, R.A.; CANTOR, F. (Ed.). **Histórico e impacto de pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p.39-41.

MALAVASI, A.; BARROS, M.D. Comportamento sexual e de oviposição em moscas-das-frutas (Tephritidae). In: SOUZA, H.M.L. (Coord). **Moscas-das-frutas no Brasil. Campinas: Fundação Cargill**, 1988. p.25-53.

MORGANTE, J.S. **Moscas-das-frutas (Tephritidae): características biológicas, detecção e controle**. Brasília, SENIR, Boletim Técnico 2, 1991. 19p.

NORRBOM, A.L. Fruit fly (Diptera: Tephritidae). Classification e diversity. 2004. Disponível em: <<http://www.sel.barc.usda.gov/Diptera/tephriti/TephClas.htm>>. Acesso em: 04 de Janeiro de 2012.

NORRBOM, A.L.; KORYTKOWSKI, C.A. A revision of the *Anastrepha robusta* species group (Diptera: Tephritidae). **Zootaxa**. v.2182, p.1–91. 2009.

NORRBOM, A.L.; KORYTKOWSKI, C.A. New species of and taxonomic notes on *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). **Zootaxa**. v.2740, p.1–23. 2011.

SOUZA-FILHO, M.F. Infestação de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae e Lonchaeidae) relacionado à fenologia da goiabeira (*Psidium guajava*), nespereira

(*Eriobotrya japonica*) e do pessegueiro (*Prunus persica*). Tese de doutorado, ESALQ/USP. Piracicaba, SP. 2006. 126p.

URAMOTO, K.; ZUCCHI, R.A. Taxonomia de espécies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). In: MALAVASI, A.; VIRGÍLIO, J. (Eds.). **Biologia, Monitoramento e Controle**: V Curso Internacional de Capacitação em Moscas-das-frutas. Juazeiro, Bahia, Brasil, 2009.

ZUCCHI, R.A. Diversidad, distribución y hospederos del género *Anastrepha* en Brasil. En: HERNÁNDEZ-ORTIZ, V. (Ed.). **Moscas de la fruta en Latinoamérica (Diptera: Tephritidae)**: Diversidad, biología y manejo. S y G editores. Distrito Federal, México, 2007. p.77-100.

ZUCCHI, R.A. Mosca-do-mediterrâneo, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). In: VILELA, E.F.; ZUCCHI, R.A.; CANTOR, F. (Ed.). **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p.15-22.

WHITE, I.A.; ELSON-HARRIS, M.M. **Fruit flies of economic significance**: their identification and bionomics. Wallingford: CAB International, 1992. 601p.

CAPÍTULO 1

Efeitos biométricos de frutos de Taperebá (*Spondias mombin* L.) sobre os índices de infestação por *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835) (Diptera: Tephritidae) e parasitismo

Danilo Baia do Nascimento¹, Ricardo Adaime², Alan Cavalcanti da Cunha³, Janisete Gomes Silva⁴

¹Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical, Rodovia JK, Km 4, 68902-280, Macapá, Amapá, Brasil

²Embrapa Amapá, Rodovia JK, km 5, nº 2600, 68903-419, Macapá, Amapá, Brasil

³Universidade Federal do Amapá, Ciências Ambientais, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical, Rodovia JK, Km 4, 68902-280, Macapá, Amapá, Brasil

⁴Centro de Biotecnologia e Genética, Departamento de Ciências Biológicas
Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, 45662-900,
Ilhéus, Bahia, Brasil

RESUMO: O objetivo do estudo foi avaliar a influência de parâmetros biométricos de frutos de taperebá (*Spondias mombin* L.) sobre os índices de infestação por *Anastrepha obliqua* (Diptera Tephritidae) e parasitismo. As variáveis estudadas foram peso, comprimento e largura dos frutos. As áreas de coleta foram as zonas urbanas dos municípios de Macapá e Santana, estado do Amapá. Foram coletadas 30 amostras de frutos de taperebá, cada uma composta por 20 frutos de uma única planta (cada fruto correspondendo a uma sub-amostra), totalizando 600 unidades amostrais. As coletas dos frutos foram realizadas aleatoriamente, a partir do dossel da planta e frutos recém-caídos. Os resultados indicaram que tanto a infestação quanto o parasitismo se concentraram em frutos de peso médio, sugerindo uma preferência pelos frutos cujas características biométricas (peso, diâmetro e comprimento) encontravam-se distantes de frutos com características de medidas extremas (muito grandes ou muito pequenos). A preferência de moscas-das-frutas por frutos de tamanho médio pode estar relacionada à estratégia de sobrevivência. Larvas que infestam frutos pequenos podem ser mais facilmente parasitadas e, de modo inverso, frutos maiores podem servir de sítio de oviposição para outras fêmeas, aumentando o potencial de competição por espaço e alimento. Com efeito, as observações sugerem que a própria planta provavelmente produz mais frutos com tamanho mediano do que frutos de grande ou de pequeno porte. Este fator pode gerar maiores taxas de infestação em frutos medianos, e conseqüentemente, o mesmo em relação ao parasitismo.

Palavras-chave: *Anastrepha*, hospedeiro, Amazônia, moscas-das-frutas

ABSTRACT: The purpose of this study was to evaluate the influence of biometric parameters of fruits of plum (*Spondias mombin* L.) on the level of infestation by *Anastrepha obliqua* (Diptera Tephritidae) and parasitism. The variables studied were weight, length and width of the fruit. Collection areas for urban areas were the cities of Macapá and Santana, Amapá. We collected 30 samples of fruits of plum, each consisting of 20 fruits from a single plant (each result corresponding to a sub-sample), totaling 600 sampling units. The samples of fruits were carried out at random from the canopy and fruit newly fallen. The results indicated that both the infestation and parasitism have focused on fruit weight, suggesting a preference for fruit whose biometric characteristics (weight, diameter and length) were distant fruit with characteristics of outliers (very large or very small). The preference of fruit flies with fruit of medium size may be related to a survival strategy. Larvae infesting small fruit can be more easily parasitized and, conversely, larger fruit can serve as an oviposition site for other females, increasing the potential for competition for space and food. Indeed, observations suggest that the plant itself probably produces more fruit with medium size fruit than large or small. This factor can generate higher rates of infestation in fruits median, and therefore the same in relation to parasitism.

Keywords: *Anastrepha*, host, Amazon, fruit flies

1 INTRODUÇÃO

O taperebazeiro (*Spondias mombin* L.), também conhecido como cajazeira, é uma espécie nativa das terras baixas do México, da América Central e América do Sul (CROAT, 1974). No Brasil, é encontrado na Amazônia e na Mata Atlântica, prováveis zonas de dispersão da espécie, e nas zonas mais úmidas dos estados do Nordeste (SANTOS-SEREJO et al., 2009). Na Amazônia, é encontrado nas florestas de várzea e de terra firme, sendo comum em ambientes antropizados (CAVALCANTE, 1976). Seus frutos globosos ou elípticos, do tipo drupa, cor variando do amarelo ao alaranjado, casca fina e lisa, com polpa suculenta e sabor ácido-adocicado, são consumidos “in natura” ou processados na forma de suco, sorvete e picolé (CAVALCANTE, 1996; SANTOS-SEREJO et al., 2009). Em alguns estados brasileiros, os frutos desta espécie sofrem severos danos, causados principalmente por moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae).

As moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* são nativas do continente americano, especificamente da Região Neotropical (ALUJA, 1994). Encontrado desde o sul dos Estados Unidos até a América do Sul, este gênero é composto atualmente por 250 espécies descritas (NORRBOM; KORYTKOWSKI, 2009; 2011) e outras em processo de descrição. No Brasil, 112 espécies já foram assinaladas, sendo seis particularmente importantes do ponto de vista econômico, dentre elas *Anastrepha obliqua* (Macquart) (ZUCCHI, 2008).

Esta espécie, também conhecida como mosca-das-frutas-das-antilhas, ocorre desde o norte do México até o sul do Brasil, sendo também encontrada nas ilhas do Caribe (FOOTE et al., 1993; HERNÁNDEZ-ORTIZ; ALUJA, 1993; ALUJA, 1994) e ocasionalmente nos estados do Texas e Califórnia, E.U.A. (EPSKY et al., 2003). No

Brasil, ela não foi registrada apenas no estado de Sergipe (URAMOTO; ZUCCHI, 2009), provavelmente porque levantamentos efetivos ainda não foram realizados.

Os hospedeiros preferenciais de *A. obliqua* são espécies da família Anacardiaceae, sendo o taperebá (*Spondias mombin* L.) o seu principal hospedeiro no estado do Amapá (SILVA et al., 2011a). No entanto, ela também causa danos severos nos pomares comerciais de manga em vários países (ALUJA et al., 1987; CARVALHO et al., 1998; 2010; FERREIRA et al., 2003).

No Brasil, *A. obliqua* é a segunda espécie mais polífaga, infestando 37 hospedeiros de pelo menos oito famílias botânicas, especialmente Anacardiaceae e Myrtaceae (ZUCCHI, 2011). No entanto, os maiores índices de infestação são registrados em espécies de Anacardiaceae, principalmente do gênero *Spondias* (UCHÔA et al., 2002; MEDEIROS-SANTANA; ZUCOLOTO, 2009; CARVALHO et al., 2010).

A importância do taperebá como planta hospedeira de *A. obliqua* no estado do Amapá tem sido observada em vários estudos (SILVA et al., 2007a; 2007b; SILVA; SILVA, 2007). Apesar disso, são raros os trabalhos conduzidos com frutos de taperebá utilizando o método de frutos individualizados (SILVA et al., 2011b), o que poderia fornecer dados mais refinados sobre a infestação por *A. obliqua* e outras espécies que ocorrem neste hospedeiro, como *Anastrepha antunesi* Lima (SILVA et al., 2007a; 2007b). Esse método é capaz de analisar o percentual de frutos infestados, índice de infestação por fruto, preferência da mosca e do parasitoide por frutos de maior ou menor tamanho, espécies de moscas compartilhando o mesmo fruto, além de associar a espécie de mosca ao respectivo parasitoide obtido da mesma amostra.

Um trabalho utilizando esse método foi realizado por Cunha et al. (2011), que avaliaram os parâmetros físicos dos frutos de taperebá (espessura da polpa, tamanho e

peso) na incidência de parasitoides de moscas-das-frutas. Os autores constataram que a espessura da polpa e as características biométricas do fruto não influenciam no parasitismo natural.

Estudos dessa natureza são importantes para compreender melhor as características que fazem do taperebá o hospedeiro preferencial de *A. obliqua* no estado do Amapá. Para isso, o ponto de partida da pesquisa é admitir a hipótese de que as espécies de moscas-das-frutas infestam aleatoriamente os frutos de taperebá, independentemente de suas dimensões geométricas ou de seu peso.

O objetivo deste trabalho foi quantificar as relações biométricas (comprimento, largura e peso) de frutos de taperebá e relacioná-las aos índices de infestação por *A. obliqua* e de parasitismo por himenópteros. Adicionalmente, objetivou-se verificar se espécies de moscas-das-frutas compartilham o mesmo fruto hospedeiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e Período de Coleta

O estudo foi realizado nas zonas urbanas dos municípios de Macapá e Santana, estado do Amapá. Foram coletadas 30 amostras de frutos de taperebá, cada uma composta por 20 frutos de uma única planta (cada fruto correspondeu a uma sub-amostra), totalizando 600 unidades amostrais. Todas as amostras foram coletadas entre os dias 1º e 02/05/2011. Os sítios de coleta foram georreferenciados com equipamento GPS.

As coletas dos frutos foram realizadas aleatoriamente, diretamente do dossel da planta e recém-caídos (em bom estado, sem infestação de insetos secundários). Em seguida, os frutos foram acondicionados individualmente em copos plásticos descartáveis e cobertos com organza presa por elástico, sendo conduzidos ao

Laboratório de Entomologia da Embrapa Amapá, em Macapá. Após o transporte, os frutos foram pesados (com auxílio de balança eletrônica de precisão) e medidos (comprimento e largura, com auxílio de paquímetro digital). Os dados foram registrados em livro de anotações para posterior digitação, tabulação e análise.

Cada recipiente com fruto foi identificado com um número específico, o qual foi anotado no livro com suas respectivas medidas e peso. Em seguida, os frutos já devidamente medidos, pesados e identificados, foram colocados sobre uma fina camada de vermiculita para manter a umidade e servir de substrato para pupação, sendo cobertos com organza presa por elástico e acondicionados em uma sala para obtenção dos pupários (SILVA et al., 2011b).

Os frutos foram inspecionados a cada cinco dias, durante 15 dias e os pupários foram retirados e acondicionados em recipientes de plástico descartáveis (contendo vermiculita), cobertos com organza presa por elástico, devidamente identificados, mantidos em câmaras climatizadas sob temperatura ($26\pm 0,5^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($70\pm 5\%$) e fotofase (12 horas) controladas, onde foram observados diariamente (SILVA et al., 2011b). As moscas-das-frutas e os parasitoides que emergiram foram fixados em etanol a 70% e identificados seguindo as chaves de Zucchi (2000) e Canal e Zucchi (2000).

Após esses procedimentos, foram calculados os índices de infestação dos frutos ($I = \text{número de pupários obtidos/número de frutos coletados}$ e $I = \text{número de pupários obtidos/peso de frutos coletados}$) e o percentual de parasitismo ($IP = \text{número de parasitoides emergidos/número de pupários} \times 100$).

2.2 Métodos Estatísticos de Análises

Inicialmente foi elaborada uma planilha com os dados biométricos dos 600

frutos. Um arquivo de dados foi gerado com extensão do tipo “.txt”, modalidade data-frame em R (CRAWLEY, 2007). Este arquivo serviu de base para as análises estatísticas descritiva e inferencial a partir dos dados da Tabela 1.

Tabela 1- Características físicas dos frutos coletados, indicação de infestados e/ou parasitados.

Nº (fruto)	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Peso (g)	Infestados*	Parasitados*
1	36,51	21,33	9,0	0	0
2	35,13	24,68	9,9	0	0
3	35,35	27,11	12,3	0	0
4	34,66	24,92	9,6	0	0
5	41,99	32,92	17,9	1	1
6	36,99	30,00	15,0	1	1
7	37,54	26,61	11,6	0	0
8	40,07	26,68	14,0	0	0
9	36,43	28,04	13,2	1	0
10	37,88	26,21	12,1	1	1
11	34,35	24,53	9,2	1	1
12	37,49	25,87	12,1	0	0
13	42,85	32,08	20,0	0	0
14	33,93	23,13	8,0	0	0
15	41,49	28,52	16,7	0	0
16	35,33	24,55	10,0	0	0
17	36,51	26,28	11,0	0	0
18	41,47	29,48	16,4	1	0
19	35,32	27,58	12,2	0	0
20	33,81	26,28	10,3	0	0
21	32,70	21,91	8,6	1	0
...
600	28,10	21,77	6,2	0	0

*Infestados/Parasitados: 0 = não; 1 = sim

Com base nesta categorização, a análise foi aprofundada seguindo o seguinte raciocínio: comparações entre três grupos de médias sendo cada um destes representado por sub-grupos: a) pesos, b) largura e c) comprimento, sendo todas representadas por categorias específicas relacionadas aos estados não infestados, infestados e parasitados.

Com base nesses agrupamentos foram obtidas as seguintes relações entre variáveis, conforme descrito abaixo: a) comparações entre médias estatísticas utilizando o método de Shapiro-Wilk (para verificação de distribuições normais das variáveis e potencial transformação) com números amostrais idênticos; b) Análise de Variância (ANOVA-One Way) para comparar médias segundo as categorias não infestada, infestada e parasitada com números amostrais distintos; c) matriz de correlação entre variáveis; d) análise de regressão linear múltipla (EMDEN, 2008; MAGNUSSON; MOURÃO, 2009; ROSENBAUM, 2010; PETERNELLI; MELLO, 2012).

Estas análises, além de comparativas, têm como objetivo desenvolver modelos preditivos que descrevem a associação entre a variabilidade do peso com os parâmetros largura e comprimento do fruto, considerando seu estado categórico não infestado, infestado e parasitado, consideradas como análises estatísticas multivariadas (LEGENDRE; LEGENDRE, 1998; BORCARD; LEGENDRE, 2002; LEMIEUX, 2009; MAGNUSSON; MOURÃO, 2009; BORCARD et al., 2011).

3 RESULTADOS

Os 600 frutos coletados totalizaram 6,7 kg (peso médio de 11,17g por fruto). Dos frutos coletados, 151 estavam infestados por moscas-das-frutas (25,2%), dos quais foram obtidos 298 pupários, com emergência de 88 moscas e 83 parasitoides (57,7% de emergência). A infestação do taperebá por moscas-das-frutas foi de 44,48 pupários/Kg. O número de pupários/fruto infestado variou de 1 a 8 (média de 1,97 pupário/fruto).

Foram obtidos 52 machos de *Anastrepha*, 18 fêmeas de *A. obliqua* e 18 fêmeas de *A. antunesi*. O índice de parasitismo foi de 27,8%, com 46 exemplares de *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti) e 37 exemplares de *Opius bellus* Gahan. Foi possível fazer uma relação entre as duas espécies de parasitoides e as duas espécies de moscas obtidas neste trabalho. Esse foi o primeiro registro da associação entre as espécies de parasitoides *O. bellus* e *D. areolatus* e a espécie de moscas-das-frutas *A. antunesi* no estado do Amapá (Tabela 2). Dos 152 frutos infestados, apenas em dois *A. obliqua* e *A. antunesi* foram encontradas simultaneamente.

Tabela 2- Espécies de parasitoides de moscas-das-frutas e seus respectivos hospedeiros

Parasitoides	IP	Moscas-das-frutas
<i>Doryctobracon areolatus</i> (46)	15,4%	<i>A. obliqua</i> <i>A. antunesi</i>
<i>Opius bellus</i> (37)	12,4%	<i>A. obliqua</i> <i>A. antunesi</i>
Total	83	27,8%

IP= índice de parasitismo

3.1 Caracterização Biométrica dos Frutos

Um resumo descritivo das características biométricas dos frutos de taperebá pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3- Análise descritiva das características biométricas dos frutos de taperebá.

Número de Frutos (N)	Comprimento C (mm)	Diâmetro L (mm)	Peso P (g)
Mínimo: 1	17,78	14,64	2,20
1° Quartil: 150.8	30,01	22,99	8,00
Mediana: 300.5	33,26	25,36	10,60
Média: 300.5	33,21	25,55	11,17
3° Quartil: 450.2	36,32	28,14	13,70
Máximo: 600	50,70	39,37	31,20
Desvio Padrão	4,83	3,92	4,44

A seguir são descritas em forma de gráficos de dispersão as variáveis biométricas dos frutos de taperebá (peso, comprimento e largura). Neste gráfico também são apresentados dois eixos do tipo “box-plot” (vertical e horizontal) para cada gráfico das Figuras 1a, b, c. Nos referidos gráficos, estão indicados o valor médio tanto da variável dependente quanto da variável independente com seus respectivos desvios padrão. Foram definidas as variáveis peso, comprimento e largura do fruto, respectivamente por P, C e L.

Nas Figuras 1a, b, c, observa-se três resultados das análises de regressões não-lineares ajustadas às equações tipo potência, tal como $y = aX^b$. Os resultados das curvas ajustadas nas análises de regressões não-lineares foram, respectivamente: $C = 0,0022P^{2,4152}$ e $R^2 = 0,78$; $L = 0,0038P^{2,4465}$ e $R^2 = 0,87$ e $L = 1,5884P^{1,5884}$ e $R^2 = 0,58$. Todas as correlações apresentaram resultados de $p < 0,05$, isto é, muito significativas.

Na Figura 1a, o comprimento do fruto é relacionado com o peso, sendo este último um bom preditor para o primeiro (próximo de 78%). Na Figura 1b, a largura do fruto também é relacionada com o peso, sendo este último um bom preditor para o primeiro (próximo de 87%). Quando relacionadas à largura e ao comprimento (Figura 1c), observa-se uma razoável correspondência entre ambos, sendo que a variável peso explica com mais precisão a variação da largura do que o comprimento próximo de 58%.

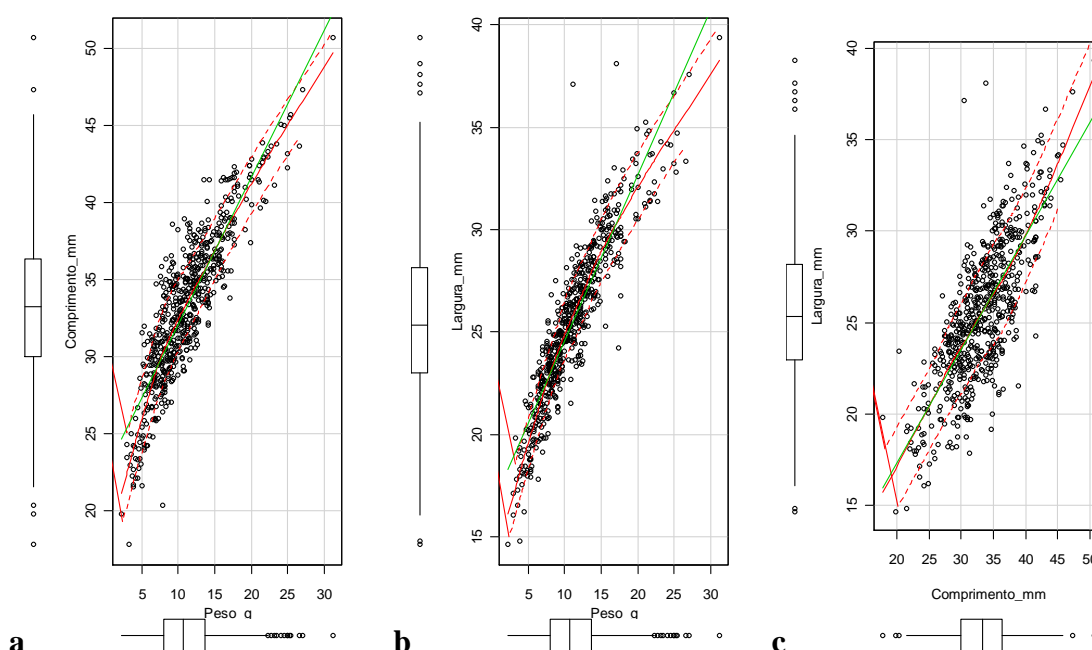


Figura 1 – Comportamento das variáveis biométricas dos frutos de taperebá: a) comprimento (mm) x peso (g), b) largura (mm) x peso (g) e c) largura (mm) x comprimento (mm).

Como análise complementar, nas Figuras 1a, b, c, eixos dos gráficos “box-plot” que indicam não estão todos centralizados no eixo horizontal. Uma visualização mais detalhada destas variações biométricas pode ser observada na Tabela 1. Por exemplo, na Figura 1a, o peso médio está próximo de 11 g, enquanto a extensão da medida total dos pesos está aproximadamente entre 5 e 30 g. Isto é, o peso médio encontra-se deslocado

para a esquerda do eixo horizontal, precisamente $8 < P < 14$, complementado por um intervalo equivalente a aproximadamente um desvio padrão. Ou seja, há maior frequência de frutos com pesos abaixo da média. Apesar da maioria dos frutos encontrarem-se na faixa próxima e abaixo da média, alguns frutos mais pesados ficaram próximos de 30 g. O mesmo ocorre com o gráfico da Figura 1b, em relação ao diâmetro dos frutos. Contudo, a variância ou dispersão em relação a média é menor do que aquela que ocorre com o gráfico que relaciona o comprimento com o peso. Por outro lado, em relação à Figura 1c, observa-se que a largura é apenas razoavelmente explicada pelo comprimento ou vice-versa. Podemos concluir que a largura deve ser a medida explicativa preferencial para avaliar análises biométricas quando se dispõe da medida peso para este tipo de fruto.

3.2 Infestação

Nas análises estatísticas, a infestação por moscas-das-frutas concentrou-se em frutos de taperebá com comprimento entre 25 e 40 mm, largura entre 20 e 30 mm e peso compreendido entre 5 e 18 g (Figuras 2a, b, c).

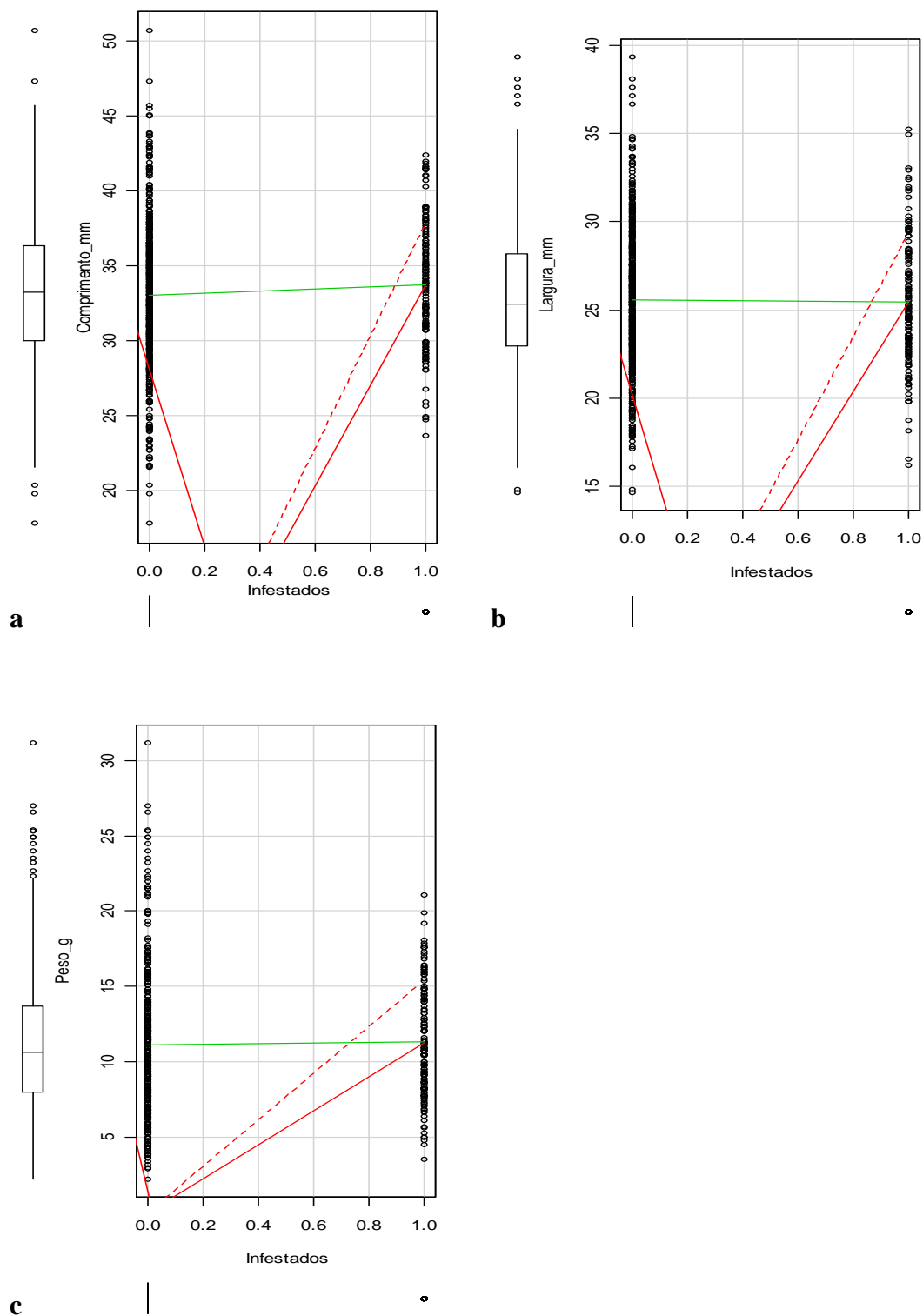


Figura 2 – Infestação de moscas-das-frutas em relação ao comprimento (a), largura (b) e peso (c) dos frutos de taperebá. Na escala das abscissas 0.0 significa ausência de infestação e 1.0 significa presença.

Ao se avaliar o índice de infestação (y) em função de análise de regressão linear múltipla em relação aos três variáveis independentes biométricas simultâneas, obtivemos os seguintes resultados (equação 1):

$$y = a + a_1C + a_2L + a_3P \quad (1)$$

Onde o coeficiente do intercepto é $a = 0,1175$, $p = 0,6818$; o coeficiente do comprimento $a_1 = 0,01658$, $p = 0,0333$; o coeficiente da largura $a_2 = -0,0158$, $p = 0,1670$; o coeficiente do peso $a_3 = -0,0015$, $p = 0,9170$. O código da significância é dado por 0 '****' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1. O erro padrão residual: 0,4306 com 596 graus de liberdade; o R-quadrado múltiplo: 0,01352, R-quadrado ajustado: 0,008557; com F-estatístico: 2,723 com 3 e 596 GL, p-valor: 0,04358.

Interpretando o resultado da regressão observa-se que a infestação (y) em função das variáveis, comprimento, largura e peso, somente o primeiro parece influenciar a infestação. Com exceção do primeiro, os demais não influenciam ou não estão relacionadas. Portanto, há uma correlação significativa, entre o comprimento do fruto e a infestação, mas esta última é pouco explicada pela variação do comprimento (R^2 é muito baixo). Conclui-se que, com exceção desta última variável, todos os demais valores de p foram maiores que 0,05, resultando em teste não significativos.

3.3 Parasitismo

O parasitismo concentrou-se em frutos de taperebá com comprimento entre 30 e 40 mm, diâmetro entre 20 e 30 mm e peso compreendido entre 3 e 22 g (Figura 3a, b, c).

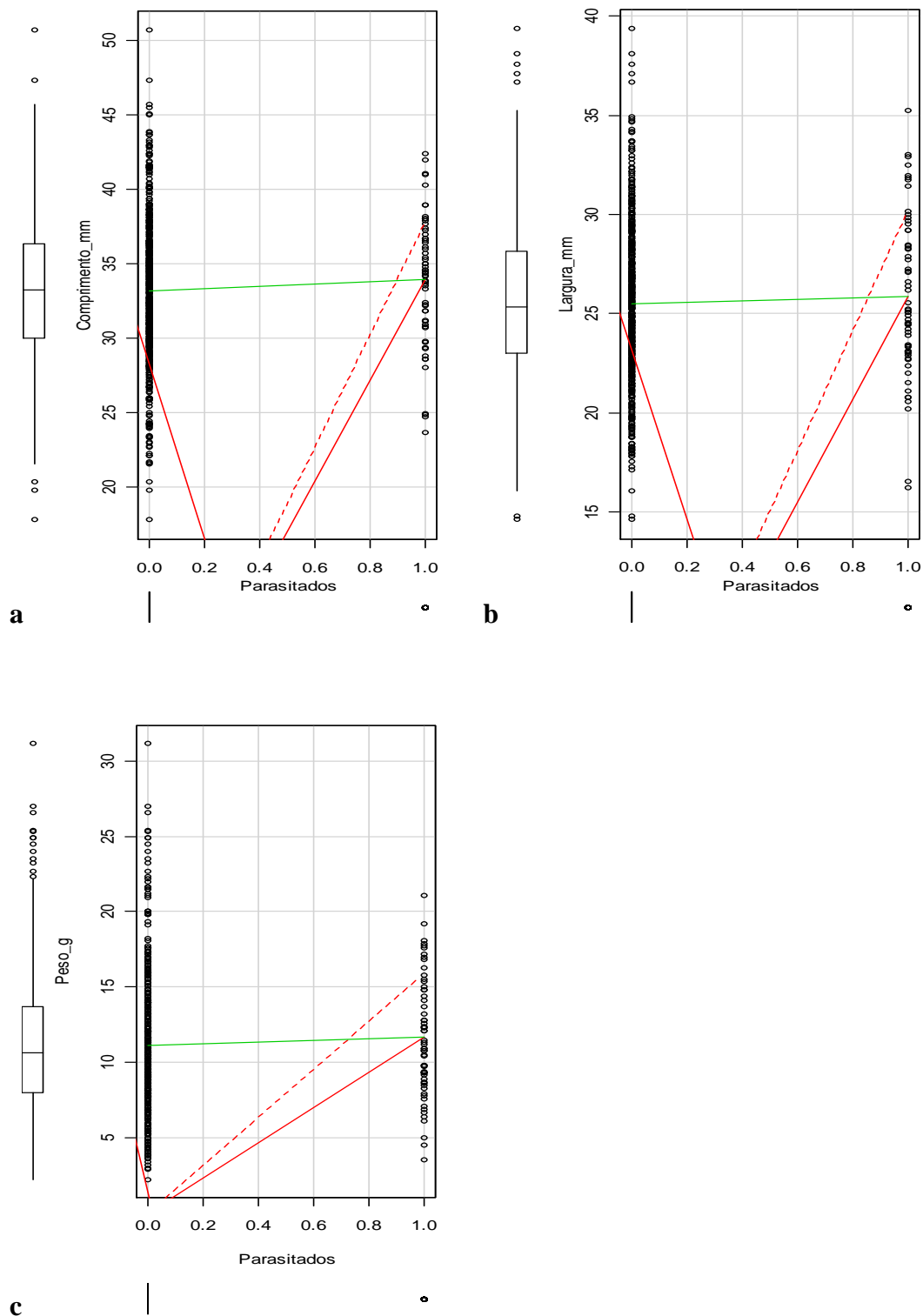


Figura 3 – Parasitismo de moscas-das-frutas em relação ao comprimento (a), diâmetro (b) e peso (c) dos frutos de taperebá. Na escala das abscissas 0,0 significa ausência de parasitismo e 1.0 significa presença.

Ao avaliar-se o índice de parasitismo (z) em função de análise de regressão linear múltipla em relação aos três variáveis independentes biométricas simultâneas foram obtidos os seguintes resultados (equação 2):

$$z = b + b_1C + b_2L + b_3P \quad (2)$$

Onde o Coeficiente do Intercepto é $b = 0,0288$, $p = 0,886$; Coeficiente do Comprimento $b_1 = 0,00397$, $p = 0,468$; Coeficiente do Diâmetro $b_2 = -0,00273$, $p = 0,734$; Coeficiente do Peso $b_3 = -0,00098$, $p = 0,918$; Código de significância: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 '' 1; Erro padrão residual: 0,3028 com 596 graus de liberdade; R-quadrado múltiplo: 0,002715, R-quadrado ajustado: -0.00238; F- Estatístico: 0,5408 com 3 e 596 GL, p-valor: 0,6545.

Interpretando o resultado da regressão, observa-se que o parasitismo (z) em função das variáveis comprimento, diâmetro e peso não explicam sua variação ou não estão relacionados. Todos os valores de p foram maiores que 0,05, ou não foram significativos.

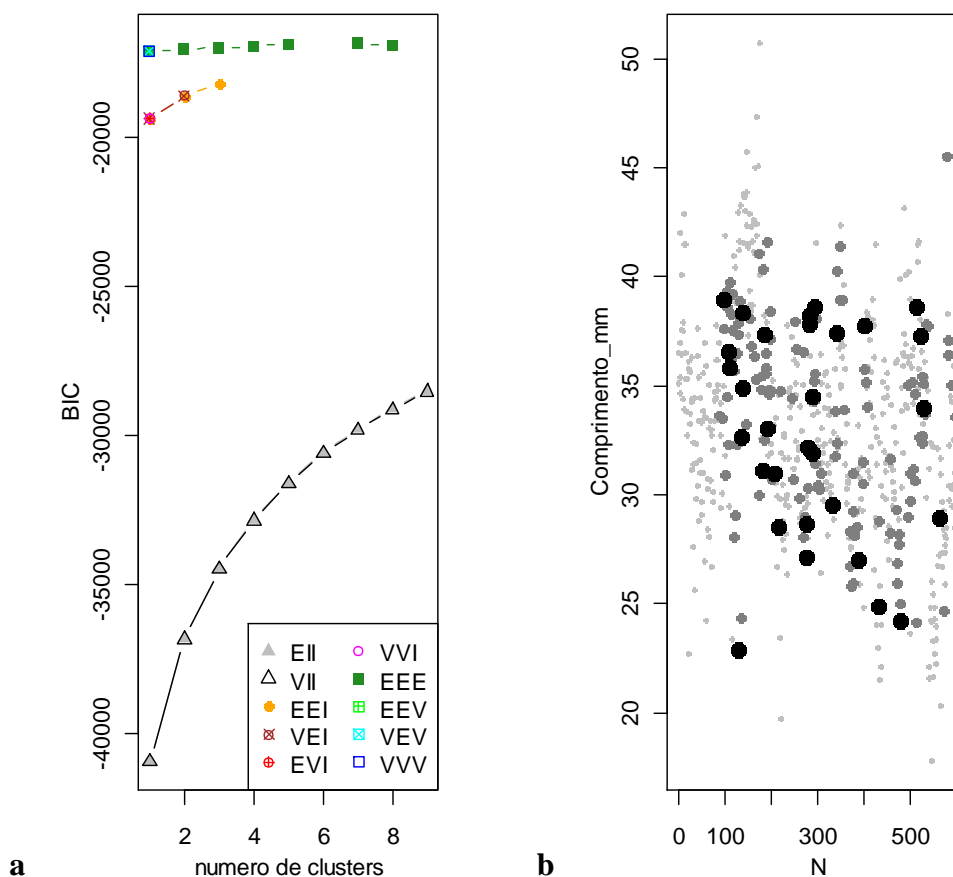


Figura 4 – Análise de clusters em relação às características biométricas, parasitismo e infestação dos frutos de taperebá. a) O BIC é o indicador da melhor escolha do modelo (EEV e VEV). b) incertezas ou probabilidade associada ao quanto é provável que aquele objeto faz parte daquele cluster que o método indicou.

Os resultados da análise de cluster indicam que valores de BIC mais elevados definem o número provável de grupos amostrais. Portanto, de acordo com o gráfico da Figura 4a, o BIC máximo encontra-se próximo de -1.800 e com valores constantes quando se aumenta o número de parâmetros (quadrados azuis e verdes na parte superior do gráfico). Ou seja, persiste na amostra global apenas um único grupo de frutos com características “homogêneas”. Os identificadores dos modelos escolhidos EEV e VEV significam, respectivamente, distribuição do aglomerado tipo (elipsoidal), volume (igual), forma (igual) e orientação (variável) do aglomerado (cluster) e distribuição

(elipsoidal), volume (variável), forma (igual) e orientação (variável) do aglomerado (cluster). Portanto, o melhor modelo e o número provável de cluster é igual a 1, sendo os EEV e VEV os mais adequados para representarem as amostras.

4 DISCUSSÃO

O índice de infestação obtido no presente trabalho foi semelhante aos obtidos em áreas periurbanas de Santana (45,7 pupários/kg) e Ferreira Gomes (52,3 pupários/kg), por Silva et al. (2007b) e Silva e Silva (2007), respectivamente, e inferior aos obtidos em áreas rurais e urbanas dos municípios de Itaubal do Pírim (141,1 pupários/kg) e Macapá (141,7 pupários/kg), por Silva et al. (2007a) e Cunha et al. (2011), respectivamente. Esse resultado também foi superior aos obtidos por Birke e Aluja (2011) em *Spondias spp.* nos municípios mexicanos de Apazapan (32 pupários/kg), Carrizal (33.5 pupários/kg), Veracruz (1.3 pupários/kg) e Tuzamapan (39.5).

O parasitismo natural pode ser considerado alto em relação aos obtidos nos municípios de Santana (10,5%), Itaubal do Pírim (11,9%) e Ferreira Gomes (21,7%), por Silva et al. (2007b), Silva et al. (2007a) e Silva e Silva (2007), respectivamente, e menor ao obtido no município de Macapá (46,6%) por Cunha et al. (2011). O parasitismo também foi superior aos obtidos por Hickel (2002) em Viçosa (10,72% e 2,63%). Com efeito, o taperebá mostrou-se um importante repositório natural de parasitoides, sendo as espécies de Braconidae: *D. areolatus* e *O. bellus*, as mais abundantes e com maior potencial de atuar na regulação populacional de moscas-das-frutas.

Pela primeira vez no estado do Amapá foi possível associar as espécies de parasitoides *D. areolatus* e *O. bellus* com *A. antunesi*. A primeira espécie havia sido

registrada simultaneamente com *A. antunesi* no estado do Pará por Pereira (2009), a segunda foi associada por Silva e Ronchi-Teles (2000) no Amazonas.

A ocorrência simultânea das espécies *A. obliqua* e *A. antunesi* em apenas dois frutos infestados, demonstra a baixa competição interespecífica, devido principalmente aos feromônios deterrentes de oviposição que as espécies deixam na superfície dos frutos após a deposição de ovos (VILELA; KOVALESKI, 2000). Esse feromônio é responsável pela marcação dos frutos que já foram ovipositados, evitando que outra espécie ou indivíduos da mesma espécie depositem seus ovos no fruto já utilizado como hospedeiro, garantindo a baixa competitividade inter e intraespecífica e a maior chance de sobrevivência das larvas.

A infestação concentrou-se em frutos de peso, diâmetro e comprimento médio, excluindo os frutos de medidas e de pesos extremos. Cabe ressaltar que o taperebá é uma árvore frutífera não domesticada e que seus frutos são muito irregulares e desuniformes variando de pequenos a grandes. A preferência de moscas-das-frutas por frutos de tamanho médio pode estar relacionada a uma estratégia de sobrevivência, pois larvas que infestam frutos muito pequenos podem ser mais facilmente parasitadas (HICKEL, 2002) e frutos muito grandes podem servir de sítio de oviposição para outras fêmeas aumentando a competição por espaço e alimento (SIVINSKI et al., 2004). Além disso, o posicionamento dos frutos na planta também pode influenciar os níveis de infestação e a preferência por frutos de tamanho mediano, porém, o que parece é que a própria planta produz mais frutos medianos do que frutos de grande e de pequeno porte, podendo ser um dos fatores que influenciam os maiores índices de infestação nesses frutos medianos.

O parasitismo assim como a infestação concentrou-se nos frutos de tamanho médio, excluindo os de maior e de menor tamanho (Figuras 3a, b, c). Esse resultado

pode ser explicado pelo fato dos parasitoides procurarem os frutos infestados e com maior chance de encontrar as larvas. Porém, segundo Hickel (2002), o parasitismo é maior em frutos de polpa menos espessa, portanto, de menores dimensões e peso. Contudo, não foi esse o resultado encontrado neste estudo.

5 CONCLUSÕES

A hipótese de que as espécies de moscas-das-frutas infestam aleatoriamente os frutos de taperebá, independentemente de suas dimensões geométricas ou de seu peso (biometria), foi rejeitada. Portanto, percebe-se que o processo de infestação e parasitismo no taperebá tende a ocorrer preferencialmente devido às características físicas dos frutos, com dimensões geométricas (diâmetro e comprimento) e gravimétrica (peso) próximas dos valores médios de suas distribuições. Este fato sugere certa rejeição das moscas pelos frutos extremamente compridos ou largos ou pesados e extremamente leves ou pequenos.

AGRADECIMENTOS

À Camila Ribeiro Lima, Luana dos Santos Pinheiro e Maria do Socorro Miranda de Sousa, pelo apoio na obtenção dos exemplares de moscas para os estudos. Ao Carlos Alberto Moraes, pelo auxílio nas coletas. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de mestrado concedida a Danilo Baia do Nascimento. À Rede Amazônica de Pesquisas sobre Moscas-das-frutas, pelo financiamento dos estudos. À Embrapa Amapá, pela infraestrutura para a realização da pesquisa. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa concedida a Ricardo Adaime.

REFERÊNCIAS

ALUJA, M. Bionomics and management of *Anastrepha*. *Annual Review of Entomology*, vol.39, p.155-178. 1994.

ALUJA, M.; CABRERA, M.; RIOS, E.; GUILLÉN, J.; CELEDONIO, H.; ENDRICHS, J.; LIEDO, P. A survey of the economically important fruit flies (Diptera: Tephritidae) present in Chiapas and a few other fruit growing regions in Mexico. *Florida Entomologist*, v.70, p.320-329. 1987.

BIRKE, A.; ALUJA, M. *Anastrepha ludens* and *Anastrepha serpentina* (Diptera: Tephritidae) do not infest *Psidium guajava* (Myrtaceae), but *Anastrepha obliqua* occasionally shares this resource with *Anastrepha striata* in nature. *Journal of Economic Entomology*, v.104, n.4, p.1204-1211, 2011.

BOMFIM, Z.V.; CARVALHO, R.S.; CARVALHO, C.A.L. Relações interespecíficas entre parasitoides nativos de moscas-das-frutas e o braconídeo exótico *Diachasmimorpha longicaudata* em frutos de ‘umbu-cajá’. *Ciência Rural* [online]. vol.40, n.1, p.77-82. 2010.

BORCARD, D.; GILLET, F.; LEGENDRE, L. **Numerical Ecology with R**. Springer, 2011. 319p.

BORCARD, D.; LEGENDRE, P. All-scale spatial analysis of ecological data by means of principal coordinates of neighbour matrices. *Ecological Modelling*, v. 153, p.51-68, 2002.

CANAL, D.N.A.; ZUCCHI, R.A. Parasitóides – Braconidae. In MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (eds) **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p.119-126.

CARVALHO, R.S.; NASCIMENTO, A.S.; FERNANDES, E.B. Dados Biológicos de *Anastrepha obliqua* Macquart (Diptera:Tephritidae) em Manga. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.27, n.3, p.469-472. 1998.

CARVALHO, R.S.; SOARES FILHO, W.S.; RITZINGER, R. Uumbu-cajá como repositório natural de parasitoide nativo de moscas-das-frutas. Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília, v.45, n.10, p.1222-1225, 2010.

CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 6a ed. Belém: CNPq/Museu Paraense Emílio Goeldi, 1996. 279p.

CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 3. ed. Belém: INPA, 1976. 166p.

CRAWLEY, M. J. **The R Book**. John Wiley & Sons. Imperial College London at Silwood Park, UK, 2007. 951p.

CROAT, T.B. A case for selection for deayed fruit maturation in *Spondias* (Anacardiaceae). **Biotropica**, v.6, n.2, p.135-137, 1974.

CUNHA, A.C.; SILVA, R.A.; PEREIRA, J.D.B.; SANTOS, R.S. Efeito da espessura da polpa, tamanho e peso de frutos de taperebá (*Spondias mombin* L.) sobre o parasitismo natural (Hymenoptera: Braconidae) em moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae). **Revista de Agricultura**, v.86, n. 2, p.125-133, 2011.

EMDEN, H.F.V. **Statistics for terrified biologists**. Blackweel Publishing, 2008. 361p.

EPSKY, N.D.; KENDRA, P.E.; HEATH, R.R. Development of lures for detection and delimitation of invasive *Anastrepha* fruit flies. In: W. Klassen, W. Colon, and W. I. Lugo (eds.), Proc. of the 39th **Annual Meeting of the Caribbean Food Crops Society**, Grenada: July 2003, p.84-89.

FERREIRA, H.J.; VELOSO, V.R.S.; NAVES, R.V.; BRAGA FILHO, J.R. Infestação de moscas-das-frutas em variedades de manga (*Mangifera indica* L.) no estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.33, n.1, p.43-48. 2003.

FOOTE, R.H.; BLANC, F.L.; NORRBOM, A.L. **Handbook of the fruit flies (Diptera: Tephritidae) of America North of Mexico**. Comstock Publishing Associates, Ithaca. 1993. 571p.

HAND, D.J. **Statistics: A very short intoduction**. Oxford University Press, 2008. 137p.

HERNÁNDEZ-ORTIZ, V.; ALUJA, M. Lista preliminar de especies del genero Neotropical *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) con notas sobre su distribución y plantas hospederas. **Folia Entomologica Mexicana**, v.88, p.89-105, 1993.

HICKS, C.R.; TURNER, J.R.K.V. **Fundamental concepts in the design of experiments**. 5th Edition, Oxford University Press, New York, 1999. 565p.

HICKEL, E.R. Espessura da polpa como condicionante do parasitismo de mosca-das-frutas (Diptera: Tephritidae) por Hymenoptera: Braconidae. **Ciência Rural**, v.32, n.6, p.1005-1009, 2002.

LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. **Numerical Ecology**. Elsevier Science, 1998. 870p.

LEVINE, D.M.; et al. **Estatística – teoria e aplicações usando o Microsoftware em português**. 3ª Edição. LTC Editora, São Paulo. 2005. 819p.

MAGNUSSON, W.E.; MOURÃO, G.M. **Basic statistics in ecological studies: Linking the Questions to the Analyses**. Oxford University Press, 2009. 119p.

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

MEDEIROS-SANTANA, L.; ZUCOLOTO, F.S. Comparison of the performances of wild *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) individuals proceeding from different hosts. **Annals of the Entomological Society of America**, v.102, n.5, p.819-825, 2009.

NORRBOM, A.L.; KORYTKOWSKI, C.A. A revision of the *Anastrepha robusta* species group (Diptera: Tephritidae). **Zootaxa**, v.2182, p.1-91, 2009.

NORRBOM, A.L.; KORYTKOWSKI, C.A. New species of and taxonomic notes on *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). **Zootaxa**, v.2740, p.1-23, 2011.

PEREIRA, J.D.B. Contribuição ao conhecimento de moscas-das-frutas (Tephritidae e Lonchaeidae) no Pará: diversidade, hospedeiros e parasitoides associados. 2009. 102p. Dissertação (Mestrado Integrado em Desenvolvimento Regional). Universidade Federal do Amapá, Macapá.

PETERNELLI, L.A.; MELLO, M.P. **Conhecendo o R: uma visão estatística** Editora UFV. Viçosa-MG, 2012. 185p.

SANTOS, W.S.; CARVALHO, C.A.L.; NASCIMENTO, A.S.; MARQUES, O.M.; FONSECA, A.A.O. Infestação Natural de *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) em Umbu-Cajá no Município de Cruz das Almas, Recôncavo Baiano. **Neotropical Entomology**, v.34, n.5, p.859-860. 2005.

SANTOS-SEREJO, J.A.; DANTAS, J.L.L.; SAMPAIO, C.V.; COELHO, Y.S. **Fruticultura Tropical: espécies regionais e exóticas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 509p.

SILVA, R.A.; DEUS, E.G.; RAGA, A.; PEREIRA, J.D.B.; SOUZA-FILHO, M.F.; COSTA NETO, S.V. Monitoramento de moscas-das-frutas na Amazônia: amostragem de frutos e uso de armadilhas. In Silva, R.A.; Lemos, W.P.; Zucchi, R.A. (eds) **Moscas-das-frutas na Amazônia brasileira: diversidade, hospedeiros e inimigos naturais**. Macapá: Embrapa Amapá, 2011b. p.33-50.

SILVA, R.A.; DEUS, E.G.; PEREIRA, J.D.B.; JESUS, C.R.; SOUZA-FILHO, M.F.; ZUCCHI, R.A. Conhecimento sobre moscas-das-frutas no Estado do Amapá. In Silva, R.A.; Lemos, W.P.; Zucchi, R.A. (eds) **Moscas-das-frutas na Amazônia brasileira: diversidade, hospedeiros e inimigos naturais**. Macapá: Embrapa Amapá, 2011a. p.225-236.

SILVA, R.A.; NASCIMENTO, D.B.; DEUS, E.G.; SOUZA, G.D.; OLIVEIRA, L.S.P. Hospedeiros e parasitoides de *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) em Itaúbal do Pírim, Estado do Amapá. **Ciência Rural**, v.37, n.2, p.557-560. 2007a.

SILVA, N. M.; RONCHI-TELES B. Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima. In Malavasi, A.; Zucchi, R.A. (eds) **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p.203-209.

SILVA, R.A.; XAVIER, S.L.O.; SOUZA-FILHO, M.F.; SILVA, W.R.; NASCIMENTO, D.B.; DEUS, E.G. Frutíferas hospedeiras e parasitóides (Hym., Braconidae) de *Anastrepha* spp. (Dip., Tephritidae) na Ilha de Santana, Estado do Amapá, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74, n.2, p.153-156. 2007b.

SILVA, W.R.; SILVA, R.A. Levantamento de moscas-das-frutas e de seus parasitóides no Município de Ferreira Gomes, Estado do Amapá. **Ciência Rural**, v.37, n.1, p.265-268, 2007.

SIVINSKI, J.; ALUJA, M.; PIÑERO, J.; OJEDA, M. Novel analysis of spatial and temporal patterns of resource use in a group of tephritid flies of the genus *Anastrepha*. **Annals of the Entomological Society of America**, v.97, n.3, p.504-512, 2004.

WILCOX, R.R. Basic Statistics: Understanding Conventional Methods and Modern Insights. Oxford University Press, 2009. 341p.

UCHÔA, M.A.; NICÁCIO, J. New Records of Neotropical Fruit Flies (Tephritidae), Lance Flies (Lonchaeidae) (Diptera: Tephritoidea), and Their Host Plants in the South Pantanal and Adjacent Areas, Brazil. **Annals of the Entomological Society of America**, v.103, n.5, p.723-733. 2010.

UCHÔA, M.A.; OLIVEIRA, I.; MOLINA, R.M.S.; ZUCCHI, R.A. Species diversity of frugivorous flies (Diptera: Tephritoidea) from hosts in the Cerrado of the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Neotropical Entomology**, v.31, n.4, p.515-524, 2002.

URAMOTO, K.; ZUCCHI, R.A. Taxonomia de espécies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). In: Malavasi, A.; Virgílio, J. (Eds.). **Biologia, Monitoramento e Controle: V Curso Internacional de Capacitação em Moscas-das-frutas**. Juazeiro, Bahia, Brasil. 2009.

VILELA, E. F.; KOVALESKI, A. Feromônios. In: Malavasi, A.; Zucchi, R.A. (eds) **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p.99-102.

ZUCCHI, R.A. **Fruit flies in Brazil - *Anastrepha* species and their hosts plants**. 2011. Disponível em: <www.lef.esalq.usp.br/anastrepha/> Acesso em 10. abr. 2012.

ZUCCHI, R.A. Espécies de *Anastrepha*, sinónimas, plantas hospedeiras e parasitóides. In Malavasi, A.; Zucchi, R.A. (eds) **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p.41-48.

CAPÍTULO 2

Estudos moleculares de populações de *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835)

(Diptera: Tephritidae) no estado do Amapá

Danilo Baia do Nascimento¹, Ricardo Adaime², Kátia Manuela Lima³, Joseane

Fernanda Passos³, Ezequiel da Glória de Deus¹, Janisete Gomes Silva³

¹Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade

Tropical, Rodovia JK, Km 4, 68902-280, Macapá, Amapá - Brasil

²Embrapa Amapá, Rodovia JK, km 5, n° 2600, 68903-419, Macapá, Amapá - Brasil

³Centro de Biotecnologia e Genética, Departamento de Ciências Biológicas

Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, 45662-900,

Ilhéus, Bahia - Brasil

RESUMO: O posicionamento filogenético e as relações sistemáticas das espécies de *Anastrepha* têm sido foco de diversas pesquisas. Várias espécies de tefritídeos, como *Anastrepha fraterculus* e *Anastrepha obliqua*, aparentemente não são monofiléticas. Porém, a espécie *A. obliqua*, que pertence ao grupo *fraterculus* e ocorre em toda a Região Neotropical, pode ser um complexo de espécies, assim como *A. fraterculus*, principalmente devido à grande variedade de biomas em que ocorre. O objetivo deste trabalho foi analisar a variação genética em populações de *A. obliqua* no estado do Amapá, utilizando um fragmento do gene mitocondrial COI, e para isso foram analisadas 10 populações de *A. obliqua* de diferentes localidades do estado do Amapá. Na análise filogenética foi obtido um fragmento de 584 pares de bases do gene mitocondrial COI para 74 espécimes de *A. obliqua*, destes 496 sítios eram conservados e 88 variáveis, dos quais 84 são informativos para parcimônia. A média da distância genética entre as populações de *A. obliqua* foi de $0,02 \pm 0,001$. Foram encontrados 28 haplótipos com diversidade haplotípica de 0,909, diversidade nucleotídica de 0,021, $G_{st} = 0,096$ e $N_m = 2,34$. O Haplótipo 1 ($f=18$) foi o mais frequente representando 24,3% das amostras. Foram obtidos 20 haplótipos exclusivos, distribuídos entre os 10 municípios estudados. As amostras dos municípios Porto Grande e Cutias do Araguari apresentaram maior número de haplótipos, com seis haplótipos cada. As análises genéticas sugerem que as populações de *A. obliqua* de todas as localidades amostradas no estado do Amapá apresentam alta diversidade mantida provavelmente devido à conservação das florestas dessa região, que possibilita a existência de uma grande diversidade de hospedeiros. A ausência de fragmentação, aliada ao movimento dos habitantes, pode favorecer a manutenção do elevado fluxo gênico entre as populações.

Palavras-chave: Caracterização molecular, moscas-das-frutas, Amazônia, COI

ABSTRACT: The phylogenetic position and the systematic relationships of *Anastrepha* species have been the focus of several studies. Several species of tephritids such as *Anastrepha fraterculus* and *A. obliqua* are apparently not monophyletic. However, species *A. obliqua*, which belongs to the group and *fraterculus* occurs across the Neotropics may be a species complex, and *A. fraterculus*, mainly due to the wide variety of biomes in which it occurs. The objective of this study was to analyze genetic variation in populations of *A. obliqua* in the state of Amapá, using a fragment of the mitochondrial COI gene, and this was analyzed 10 populations of *A. obliqua* in different locations in the state of Amapá. Phylogenetic analysis was obtained in a fragment of 584 bp of the mitochondrial COI gene for 74 specimens of *A. obliqua*, 496 of these sites were conserved and 88 variables, of which 84 are informative for parsimony. The average genetic distance between populations of *A. obliqua* was 0.02 ± 0.001 . There were 28 haplotypes with a haplotype diversity 0.909, nucleotide diversity of 0.021, $G_{st} = 0.096$ and $N_m = 2.34$. The Haplotype 1 ($f = 18$) was the most frequent representing 24.3% of the samples. We obtained 20 unique haplotypes distributed among 10 municipalities. Samples of the municipalities of Porto Grande and Cutias do Araguari had the highest number of haplotypes, each with six haplotypes. Genetic analyzes suggest that populations of *A. obliqua* from all locations sampled in the state of Amapá have maintained high diversity probably due to forest conservation in this region, which allows the existence of a wide variety of hosts. The absence of fragmentation, coupled with the movement of people, can promote the maintenance of high gene flow between populations.

Keywords: Molecular characterization, fruit flies, Amazon, COI

1 INTRODUÇÃO

Informações moleculares são fontes de caracteres e muitas vezes permitem a resolução de relações filogenéticas em situações em que a morfologia não pode resolver. De acordo com Avise (1994), é comum estudos de DNA mitocondrial (DNAmt) revelarem variações entre populações de diferentes áreas geográficas.

Caterino et al. (2000), em sua revisão sobre a sistemática molecular de insetos, relatou vários trabalhos relacionados ao uso dos genes COI e COII e em relação à sistemática molecular de dípteros, dentre os quais destacam-se Ayala et al. (1996), Wetterer et al. (1998) e Chiotis et al. (2000). Nos últimos anos, esta técnica tem sido aplicada para elucidar problemas taxonômicos para a família Tephritidae, principalmente para o gênero *Anastrepha*.

O primeiro estudo a usar sequências de DNA para analisar as relações entre diferentes grupos de espécies dentro do gênero *Anastrepha* foi realizado por McPherson et al. (1999), no qual foram analisadas 40 espécies pertencentes a 14 grupos específicos, incluindo 10 espécies do grupo *fraterculus*, usando sequências do gene mitocondrial RNA ribossomal 16S. Esse estudo não elucidou satisfatoriamente as relações dentro do grupo *fraterculus* devido à reduzida variação das sequências do 16S.

O posicionamento filogenético e as relações sistemáticas das espécies de *Anastrepha* têm sido foco de pesquisas de Biólogos evolucionistas, Entomologistas e Agrônomos (SILVA, 2008). Diversas espécies de tefritídeos, como *Anastrepha fraterculus* (Wied. 1830) e *Anastrepha obliqua* (Macquart 1835), aparentemente não são monofiléticas (SMITH-CALDAS et al., 2001). Sabe-se, porém, que a espécie *A. obliqua*, que pertence ao grupo *fraterculus* e ocorre em toda a Região Neotropical, pode ser na verdade um complexo de espécies, assim como *A. fraterculus*, principalmente devido à grande variedade de biomas em que ocorre.

A espécie *A.obliqua* tem ampla distribuição geográfica e ocorre desde o norte do México até o sul do Brasil, sendo também encontrada nas ilhas do Caribe (FOOTE et al., 1993; HERNÁNDEZ-ORTIZ; ALUJA, 1993; ALUJA, 1994) e ocasionalmente nos estados do Texas e Califórnia, E.U.A. (EPSKY et al., 2003). No Brasil, é a segunda espécie mais polífaga, infestando 37 espécies de hospedeiros de oito famílias botânicas (ZUCCHI, 2011).

Os hospedeiros preferenciais desta espécie de tefritídeo são espécies da família Anacardiaceae, sendo o taperebá (*Spondias mombin* L.) o seu principal hospedeiro no estado do Amapá (SILVA et al., 2011). No entanto, essa espécie também causa danos severos nos pomares comerciais de manga em vários países (ALUJA et al., 1987; CARVALHO et al., 1998; 2010; FERREIRA et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi analisar a variação genética em populações de *A. obliqua* no estado do Amapá utilizando um fragmento do gene mitocondrial COI. Por ser uma espécie importante do ponto de vista econômico, com ampla distribuição geográfica e adaptada a vários biomas é imprescindível que se realize um estudo desta natureza. Além disso, este trabalho justifica-se pela complexidade taxonômica existente no gênero *Anastrepha* os dados obtidos a partir deste estudo constituir-se-ão em importantes ferramentas diagnósticas para uma melhor descrição da diversidade taxonômica deste grupo e definição de estratégias mais eficientes de controle da espécie em questão.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos exemplares de *Anastrepha obliqua*

Foram analisadas 10 populações de *A. obliqua* de diferentes localidades do estado do Amapá (Figura 1 e Tabela 1). Os exemplares foram obtidos a partir de frutos de taperebá coletados aleatoriamente diretamente sob o dossel da planta e recém-caídos em bom estado. Em cada município, foram coletados 100 frutos de diversas plantas para garantir a variabilidade genética das fêmeas de *A. obliqua*, em seguida, os frutos foram acondicionados em bandejas com uma fina camada de areia esterilizada e cobertas com organza presa por elástico, posteriormente foram acondicionadas em uma sala para obtenção dos pupários (SILVA et al., 2011).

As amostras foram examinadas a cada cinco dias para a remoção dos pupários. Depois de separados, os pupários foram contados e transferidos para frascos de plástico transparente contendo uma camada fina de vermiculita umedecida e cobertos com organza presa por tampa vazada. Os frascos foram dispostos em câmaras climatizadas sob condições controladas de temperatura ($26,5\pm 0,3^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($70\pm 5\%$) e fotofase (12 horas) e observados diariamente, para obtenção de moscas-das-frutas. Após a emergência, os insetos permaneceram vivos por pelo menos 24 horas nas câmaras, para que suas estruturas morfológicas adquirissem coloração peculiar, importante para a identificação taxonômica (SILVA et al., 2011).

Os insetos foram acondicionados em frascos de vidro contendo etanol 70% para posterior identificação, sendo as respectivas informações registradas em planilhas. A identificação dos exemplares de *Anastrepha* foi realizada em nível de espécie baseando-se no exame ventral do ápice do acúleo, com base na chave de Zucchi (2000). Os 10 exemplares de cada população destinados aos estudos moleculares foram transferidos para etanol absoluto com um código de identificação que distingue o local da coleta.

Espécimes “voucher” serão depositados em uma Coleção Entomológica a ser criada no Laboratório de Entomologia da Embrapa Amapá.

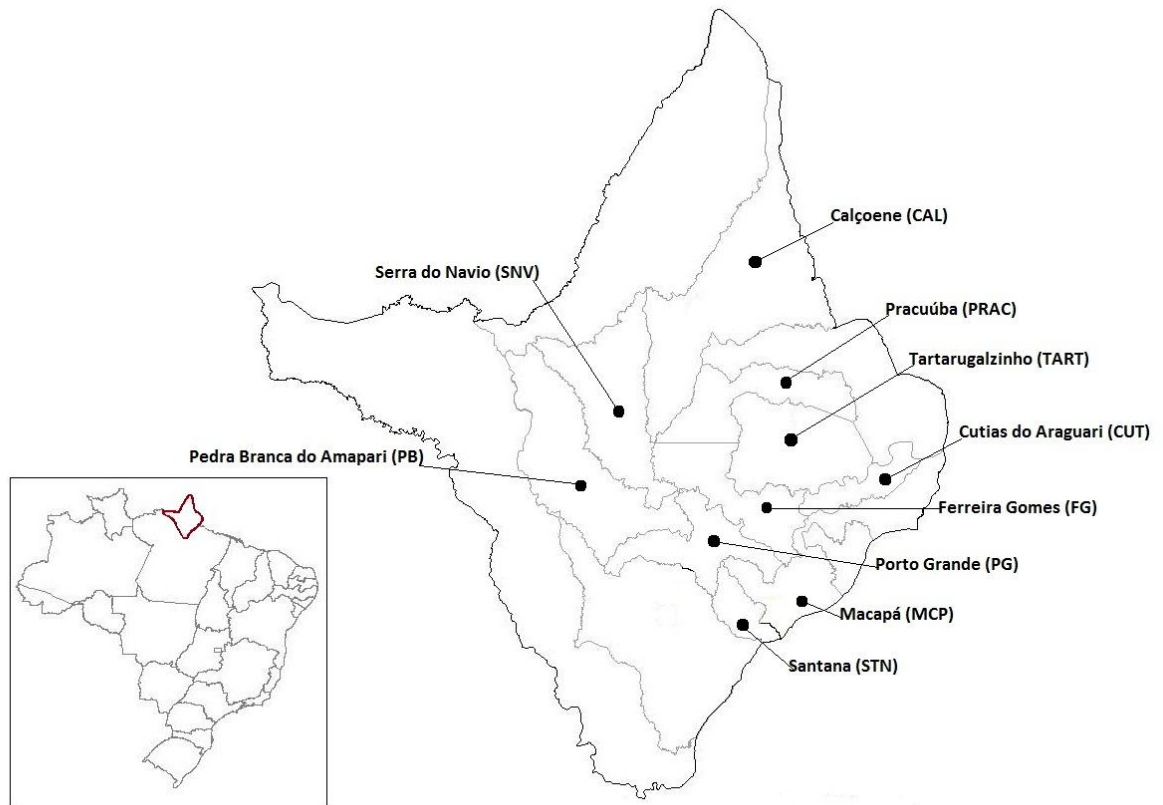


Figura 1 - Mapa do Estado do Amapá com os pontos de coleta de exemplares de *A. obliqua*. Os 10 municípios onde foram feitas as coletas estão representados pelos pontos. (Adaptado de IBGE, 2011).

Tabela 1 - Locais de coleta de exemplares de *A. obliqua* com as coordenadas geográficas, número de amostras coletadas e número de amostras sequenciadas.

País	Localidade	Latitude Longitude	Estado	Nº fêmeas coletadas	Nº fêmeas sequenciadas
Brasil	Serra do Navio (SNV)	N 0° 52' 8,7" W 52° 1' 32,8"	AP	10	8
Brasil	Macapá (MCP)	N 0° 1' 57,4" W 51° 3' 42,1"	AP	10	10
Brasil	Cutias do Araguari (CUT)	N 0° 57' 20,1" W 50° 47' 1,9"	AP	10	10
Brasil	Santana (STN)	S 0° 2' 32,0" W 51° 10' 4,1"	AP	10	8
Brasil	Tartarugalzinho (TART)	N 1° 30' 20,1" W 50° 54' 38"	AP	10	6
Brasil	Porto Grande (PG)	N 0° 42' 22,6" W 51° 24' 30,2"	AP	10	9
Brasil	Pracuúba (PRAC)	N 1° 43' 26,6" W 50° 52' 29,3"	AP	10	9
Brasil	Pedra Branca do Amapari (PB)	N 0° 46' 12,9" W 51° 57' 12,1"	AP	10	4
Brasil	Ferreira Gomes (FG)	N 0° 50' 54,7" W 51° 11' 25,5"	AP	10	6
Brasil	Calçoene (CAL)	N 2° 29' 58,5" W 50° 56' 32,8"	AP	10	4
Total				100	74

2.2 Extração de DNA

O DNA total foi extraído a partir de tecido muscular (pernas) das fêmeas, utilizando-se o kit “DNeasy Blood & Tissue kit” (Qiagen®), segundo o protocolo do fabricante para extração destrutiva.

2.3 Amplificação do fragmento do gene mitocondrial que codifica para a subunidade I da citocromo oxidase (COI)

Um fragmento da região do genoma mitocondrial (COI) utilizado na presente análise foi isolado e amplificado através da técnica de PCR (Reação em cadeia da polimerase) usando-se as seguintes combinações de “primers”: LCO-1490 (5-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3) e HCO-2198 (5-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3) (FOLMER et al., 1994).

Para a reação de amplificação foram utilizados tampão de reação 1X, 250 μ M de cada um dos di-nucleotídeos tri-fostato (A, T, C, G), 10 μ M de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (“primers”), cloreto de magnésio 25 mM, 0,25 unidades de Taq DNA polimerase e água-milliQ estéril, 3 μ L de DNA total, em um volume final de 25 μ L.

A amplificação foi realizada em termociclador (Termociclador Mastercycler Gradiente, Eppendorf) com programa específico para o protocolo de amplificação que consiste em 3 minutos de desnaturação inicial a 94°C, seguido de 39 ciclos de desnaturação por 1 minuto a 94°C, anelamento por 1 minuto a 50°C e extensão por 1 minuto a 72°C. Ao final da reação uma etapa de extensão a 72°C por 10 minutos. Em cada reação foi incluída um controle negativo para verificar a ocorrência de contaminação.

Foram corridos géis de agarose a 2% corados com brometo de etídeo (5 mg/mL), com tampão TBE 0,5X. As amostras foram preparadas de acordo com Sambrook et al. (1989) para verificação dos fragmentos amplificados utilizando-se 2 μ L de produto de PCR, 3 μ L de uma solução de azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, sacarose 40% e 4 μ L de água milli-Q estéril.

Como marcador de peso molecular foi utilizado Φ X174 RF digerido com *Hae*III (“Fermentas Life Sciences”), para verificar o tamanho e a concentração dos fragmentos de DNA dos produtos de PCR. Após cerca de 30 minutos de eletroforese, os

géis foram visualizados sob luz UV (cerca de 300 nm) e fotografados com câmara digital Kodak Digital Science DC120 Zoom acoplada a um computador equipado com o programa Kodak Digital Science TM Electrophoresis Documentation and Analysis System 120. Os produtos de PCR foram estocados em “freezer” a -20°C para posterior sequenciamento.

2.4 Reação de Purificação dos fragmentos amplificados

Após a amplificação do DNA pela reação de PCR, as amostras foram purificadas para a eliminação de resíduos de “primers”, de RNA e desoxirribonucleotídeos (dNTPS) que podem interferir no sequenciamento. Para a purificação, foram utilizadas as enzimas exonuclease I de *Escherichia coli* (EXO1) e fosfatase alcalina de camarão (SAP) e o produto de PCR.

As reações de purificação foram realizadas em termociclador (Termociclador Mastercycler Gradiente, Eppendorf) onde foram incubados a 37°C por 30 minutos e em seguida a 80°C por 15 minutos. Para cada reação de purificação foram corridos géis de agarose a 2,0% corados com brometo de etídeo ($5\mu\text{g}/\text{mL}$), utilizando o tampão TBE 0,5X preparado de acordo com Sambrook et al. (1989).

As amostras foram preparadas utilizando-se $12\ \mu\text{L}$ de produto de PCR na concentração de $20\ \text{ng}/\mu\text{L}$, $0,66\ \mu\text{L}$ de EXOI, $0,66\ \mu\text{L}$ de SAP e $0,68\ \mu\text{L}$ de água Milli-Q, totalizando $20\ \mu\text{L}$ de solução. Os géis foram fotografados utilizando-se o sistema Image Quant 350 (GE Healthcare).

2.5 Sequenciamento

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados em sequenciador automático Mega BACE 1000 DNA Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech)

no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo com os mesmos “primers” utilizados nas reações de amplificação. O sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados foi realizado de acordo com as instruções do fabricante do “kit” de sequenciamento DYEnamic ET DyeTerminator (com Thermostequeenase™ II DNA polimerase da Amersham Biosciences) específico para uso em sequenciadores de DNA Mega BACE™.

Para a reação de sequenciamento, utilizou-se 1,0 µL de produto de PCR (20 µg/µL) purificado, 1,5 µL de água Mili-Q, 0,5 µL de “primer” (5µM) e 2,0 µL de “mix” do “kit” DYEnamic ET DyeTerminator. Após o preparo da reação, a mesma foi levada ao termociclador com um programa de 40 ciclos nas condições seguintes: 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 80 segundos. Após o término do processo, o tubo com a reação foi embalado em papel alumínio e conservado a -20° C.

Ambas as fitas de DNA foram seqüenciadas para cada espécime utilizando-se os “primers” “forward” e “reverse”, para evitar ambiguidades.

2.6 Análise dos dados

As sequências foram editadas no programa BIOEDIT 7.0.5.2 (HALL, 1999) e alinhadas com auxílio da ferramenta Clustal W Multiple Alignment (THOMPSON et al., 1994) implementado no programa BIOEDIT 7.0.5.2 (HALL, 1999). O número de haplótipos, diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (Pi), divergência genética entre as populações (Gst) e número de migrantes por geração (Nm) foram estimados no programa DNAsp 4.0 (ROZAS et al., 2006). A rede de haplótipos foi obtida pelo programa NETWORK 4.5.1.0 (BANDELT et al., 2008). A árvore da reconstrução filogenética foi obtida no programa MEGA 4.1 (TAMURA et al., 2007) com o método Neighbor-Joining (NJ) utilizando-se a distância Kimura-2-Parâmetros

(Kimura 1980). O Bootstrap da análise de NJ (1.000 repetições) foi realizado para estimar o suporte da topologia dos ramos. Dois exemplares de *Anastrepha pickeli* Lima, do grupo *spatulata*, foram utilizados como grupo externo.

3 RESULTADOS

3.1 Análise Filogenética

Foi obtido um fragmento de 584 pares de bases do gene mitocondrial COI para 74 espécimes de *A. obliqua* de 10 localidades do estado do Amapá (Tabela 1). Foi obtido um total de 496 (84,9%) sítios conservados e 88 (15,1%) variáveis, dos quais 84 (14,4%) são informativos para parcimônia. O conjunto das sequências apresentou desvio na composição nucleotídica, verificando-se uma porcentagem de A+T: 68,8% e C+G: 31,3%. A média da distância genética entre as populações de *A. obliqua* foi de $0,02 \pm 0,001$. O nível máximo de distância genética encontrado entre os pares de sequências foi de 0,08 entre *A. obliqua* de Porto Grande e Ferreira Gomes (PG/FG) e Porto Grande e Tartarugalzinho (PG/TART).

As análises filogenéticas recuperaram uma árvore que apresentou três cladogramas principais (I, II e III) apresentados na Figura 2. O clado I apresentou um grupo com menor diversidade que incluiu populações dos 10 municípios estudados com pequenos agrupamentos entre as populações. O clado II é formado por dois grandes agrupamentos, o primeiro apresenta menor variação genética entre os espécimes em relação ao segundo. Este clado também é composto por populações dos 10 municípios amostrados, onde um indivíduo do município de Macapá (MCP) posicionou-se como grupo irmão do restante do clado. O clado III apresenta o menor número de espécimes (10) ocorrendo apenas nos municípios de Pracuúba (PRAC), Serra do Navio (SNV), Porto Grande (PG), Tartarugalzinho (TART) e Ferreira Gomes (FG).

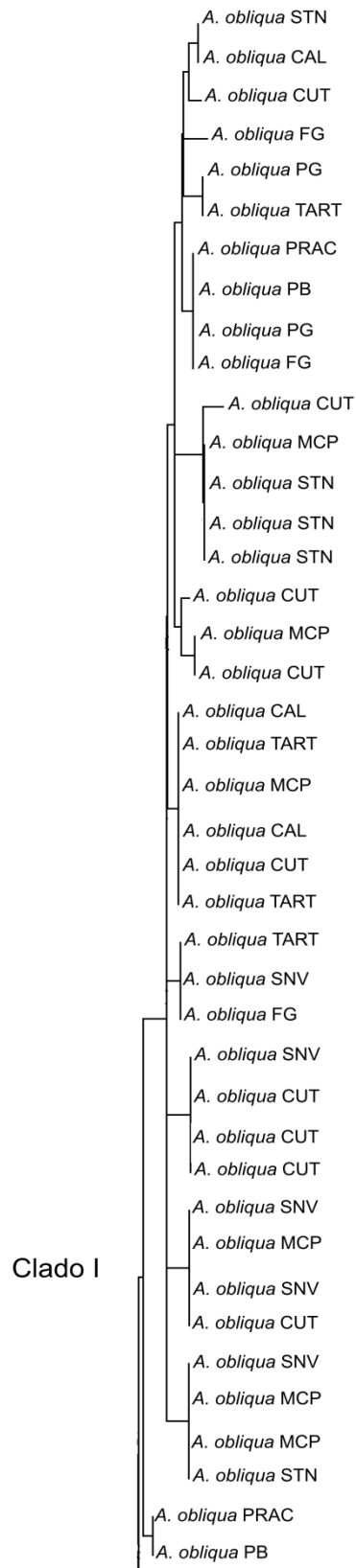


Figura 2 - Reconstrução filogenética de *A. obliqua* baseada na região do genoma mitocondrial (COI) utilizando método Neighbor-Joining (NJ) e distância Kimura-2 Parâmetros.

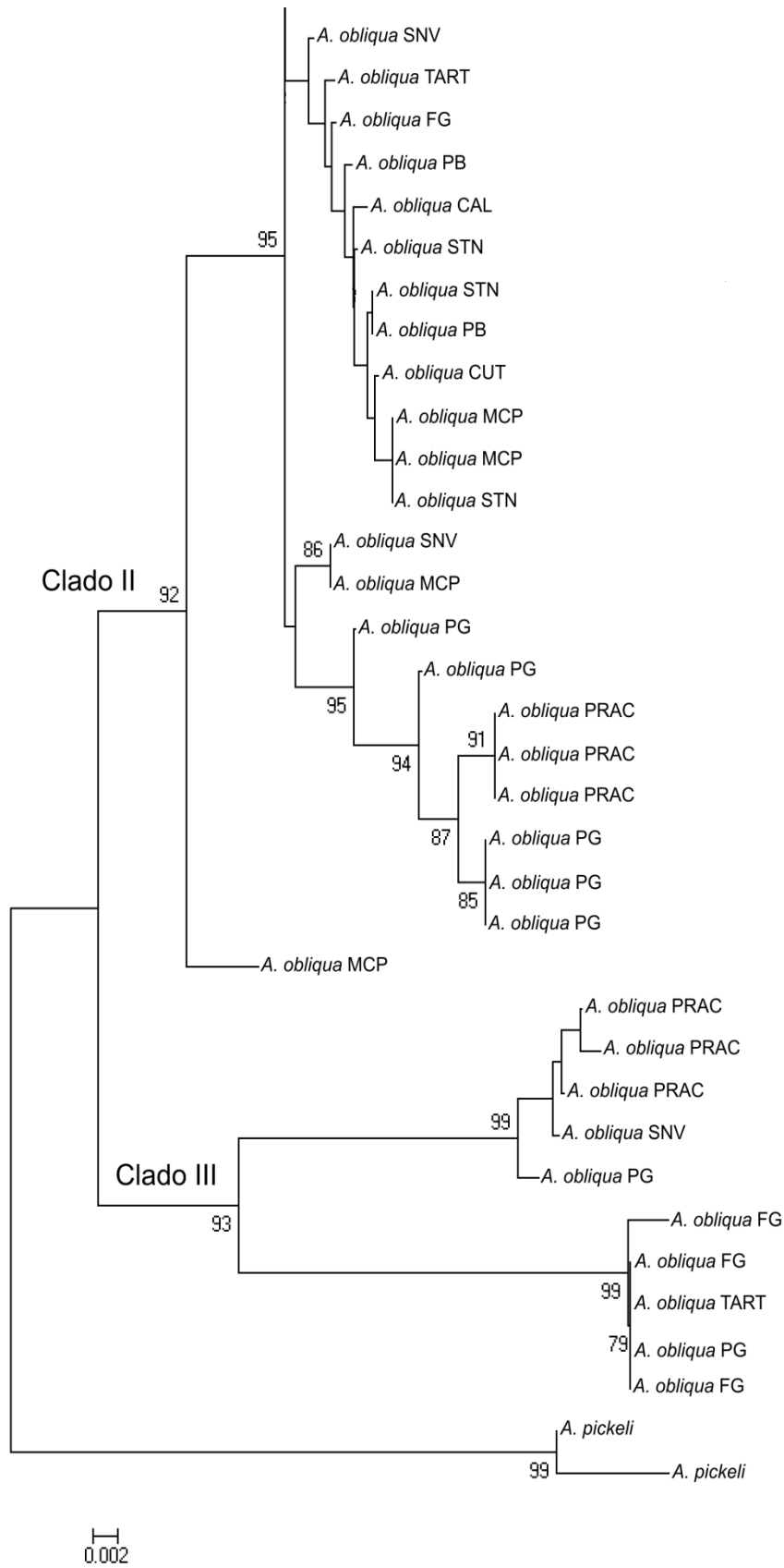


Figura 2 – Continuação.

3.2 Análise Haplotípica

Foram encontrados 28 haplótipos (denominados de H1-H28) com diversidade haplotípica de 0,909, diversidade nucleotídica de 0,021, $G_{st}= 0,096$ e $N_m= 2,34$. A frequência e distribuição dos haplótipos estão apresentadas na Tabela 2. O H1 ($f=18$) foi o haplótipo mais frequente representando 24,3% das amostras, sendo encontrado em quatro populações Macapá, Santana, Serra do Navio e Cutias do Araguari, seguido pelo haplótipo H3 ($f=11$) representando 15%, presente em seis populações Serra do Navio, Porto Grande, Tartarugalzinho, Ferreira Gomes, Pracuúba e Pedra Branca do Amapari (Figura 3). As amostras dos municípios Porto Grande e Cutias do Araguari apresentaram maior número de haplótipos, com seis haplótipos cada, seguido dos municípios Macapá, Santana, Serra do Navio, Ferreira Gomes e Pracuúba, com cinco haplótipos. A maior diversidade haplotípica (H_d) foi encontrada no município de Calçoene com ($H_d= 1,000$) seguido do município de Ferreira Gomes com ($H_d= 0,933$). A menor diversidade haplotípica encontrada foi de 0,777 em Cutias do Araguari. A menor diversidade nucleotídica foi encontrada nos municípios de Cutias do Araguari, Calçoene e Pedra Branca do Amapari ($P_i= 0,004$). A maior diversidade nucleotídica foi encontrada nos municípios de Porto Grande, Pracuúba e Ferreira Gomes ($P_i= 0,04$).

Tabela 2 - Frequência e distribuição de haplótipos mitocondriais para cada local de coleta com seus respectivos códigos (MCP-Macapá; STN-Santana; SNV-Serra do Navio; PG- Porto Grande; TAR-Tartarugalzinho; FG-Ferreira Gomes; CUT- Cutias do Araguari; PRAC-Pracuúba; PB-Pedra Branca do Amapari; CAL-Calçoene).

	MCP	STN	SNV	PG	TAR	FG	CUT	PRAC	PB	CAL
H1	5	4	4				5			
H2	1		1							
H3			1	2	2	2		2	2	
H4			1							
H5			1							
H6	1				2		1			2
H7	2	1								
H8	1									
H9								1		
H10								1		
H11								3		
H12								1		
H13							1			
H14							1			
H15							1			
H16		1				1	1			1
H17		1							1	
H18		1								
H19				2	1	1				
H20				1						
H21				1						
H22				1						
H23				3						
H24										1
H25					1					
H26									1	
H27						1				
H28						1				

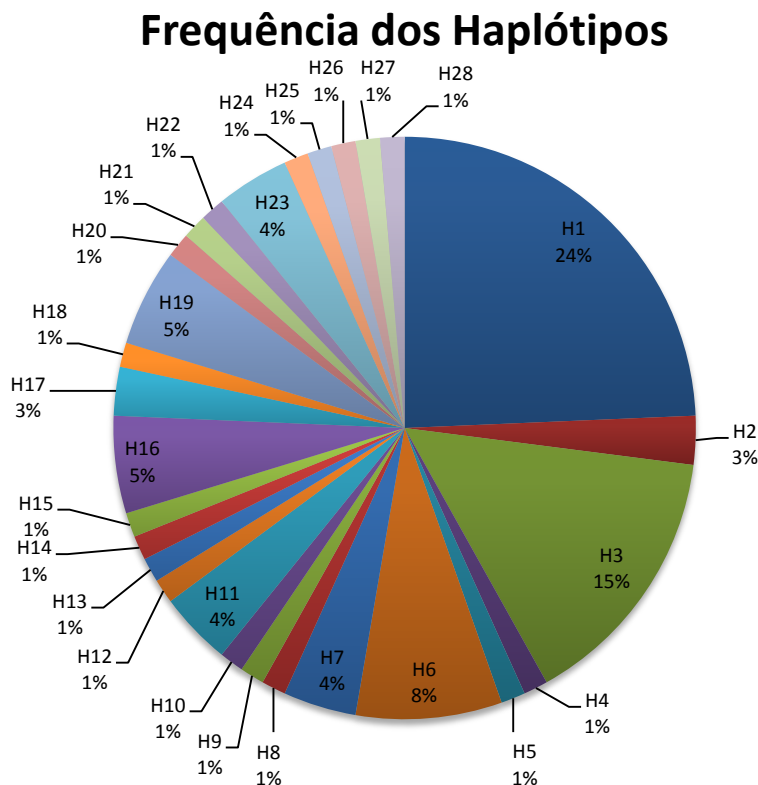


Figura 3 - Haplótipos das 74 sequências de populações de *A. obliqua* obtidas de 10 municípios do estado do Amapá.

A relação entre os haplótipos mitocondriais é apresentada na rede de haplótipos (Figura 4). O H1 é o mais frequente e os demais estão distribuídos por toda a rede apresentando alto nível de variabilidade genética. Os haplótipos mais próximos divergem do H1 por um passo mutacional e os mais distantes por oito passos mutacionais. Foram obtidos 20 haplótipos exclusivos, distribuídos entre os 10 municípios estudados. Os haplótipos H4 e H5 são exclusivos de Serra do Navio (SNV), o H8 é exclusivo de Macapá (MCP), os haplótipos H9, H10, H11 e H12 são exclusivos de Pracuúba (PRAC), os haplótipos H13, H14 e H15 são exclusivos de Cutias do Araguari (CUT), o H18 é exclusivo de Santana (STN), os haplótipos H20, H21, H22 e H23 são exclusivos de Porto Grande (PG), o H24 é exclusivo de Calçoene (CAL), o H25 é exclusivo de Tartarugalzinho (TART), o H26 é exclusivo de Pedra Branca do Amapari (PB) e os haplótipos H27 e H28 são exclusivos do município de Ferreira

Gomes (FG). Os haplótipos exclusivos apresentaram uma frequência de 27% e estão representados na Figura 4 pelos círculos com apenas uma cor.

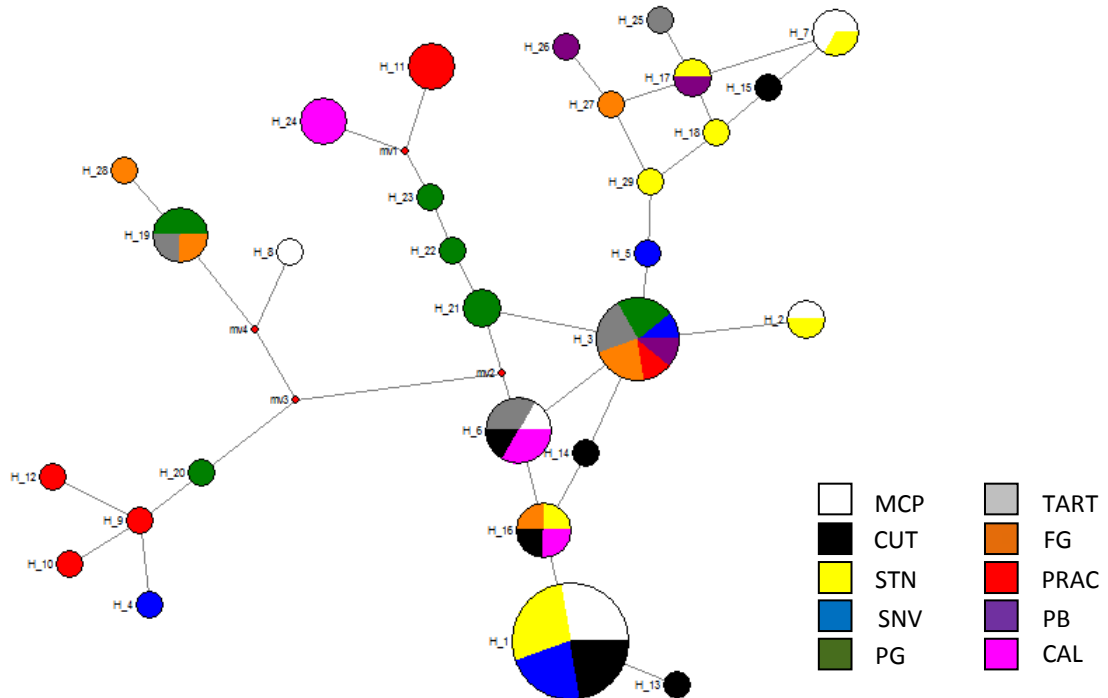


Figura 4 - Rede de haplótipos baseada na região mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI). Os haplótipos amostrados estão indicados por círculos coloridos e os haplótipos não amostrados estão representados por pequenos pontos vermelhos. Os haplótipos foram coloridos de acordo com os diferentes municípios: Macapá (MCP), Cutias do Araguari (CUT), Santana (STN), Serra do Navio (SNV), Porto Grande (PG), Tartarugalzinho (TART), Ferreira Gomes (FG), Pracuúba (PRAC), Pedra Branca do Amapari (PB) e Calçoene (CAL).

4 DISCUSSÃO

Neste estudo, realizado a partir de um fragmento de COI, foi encontrado 68,8% de A+T, considerado um conteúdo elevado, típico de DNA mitocondrial de insetos e do gene COI em particular (CLARY; WOLSTENHOLME, 1985). Essa assimetria foi registrada em muitos estudos no DNA mitocondrial de insetos e pode ser causada por um enviesamento no uso de nucleotídeos A ou T na terceira posição do códon (STEWART; BECKENBACH, 2006).

Neste estudo, foi detectada uma alta diversidade de haplótipos entre as populações, uma baixa estrutura genética ($G_{st} = 0,096$) e alto fluxo gênico ($N_m = 2,34$), característico de áreas com reduzida fragmentação de florestas, típicas das regiões amostradas. Foram encontrados 20 haplótipos únicos de um total de 74 indivíduos analisados. Ruiz-Arce (2009), em um estudo com *A. obliqua* de diferentes localidades do estado de Veracruz, México, utilizando os genes (COI+ND1), obteve 22 haplótipos únicos de um total de 400 indivíduos analisados, um número proporcionalmente baixo se comparado aos resultados apresentados neste estudo. A diversidade haplotípica e nucleotídica obtidas neste trabalho foram 0,909 e 0,021 respectivamente, mais altas do que os valores encontrados por Ruiz-Arce (2009), 0,6846 e 0,0017 respectivamente. Isso demonstra a grande diversidade genética existente na região amazônica, característica comum de centros de origem e dispersão de espécies. Esta diversidade pode ser explicada por uma grande diversidade e disponibilidade de recursos para oviposição (SILVA, 2008). De acordo com este autor, estes fatores podem ser responsáveis por divergências genéticas intrapopulacionais e, em uma escala temporal e espacial maior, podem gerar dissimilaridades entre populações de determinada espécie. Assim, o surgimento de adaptações que possibilitem a exploração mais eficiente de hospedeiros, ou ainda a exploração de novos hospedeiros acarreta maiores graus de

diferenciação genética. Dessa forma, regiões que ainda possuem florestas bastante conservadas e com grande disponibilidade de hospedeiros tendem a apresentar populações com diversidade genética mais alta. Além disso, populações ancestrais geralmente possuem altos níveis de diversidade genética em contraste com as populações estabelecidas mais recentemente, que muitas vezes mostram baixa diversidade (WU et al., 2011).

A maior distância genética encontrada foi de 0,08 entre as populações dos municípios de Porto Grande e Ferreira Gomes (PG/FG) e Porto Grande e Tartarugalzinho (PG/TART). O nível médio de distância genética entre as populações de $0,02 \pm 0,001$ foi igual ao encontrado por McPheron et al. (1999), $0,02 \pm 0,002$ em estudos utilizando a região mitocondrial DNAr 16S, e menor do que os observados por Smith-Caldas et al. (2001), $0,03 \pm 0,006$ em estudos com um fragmento do gene mitocondrial COI, ambos entre espécies do grupo *fraterculus*.

Apesar deste estudo ter sido realizado com moscas obtidas somente de frutos de taperebá, a espécie em questão infesta também 11 espécies de Myrtaceae, outras seis espécies de Anacardiaceae e duas espécies de Malpighiaceae, além de uma espécie das famílias Sapotaceae, Apocynaceae, Combretaceae, Chrysobalanaceae e Oxalidaceae na Amazônia brasileira (ZUCCHI et al., 2011). Do mesmo modo, há uma gama de potenciais hospedeiros nativos em toda essa região e que ainda não foram estudados, os quais possivelmente podem servir de hospedeiros secundários na ausência do seu hospedeiro preferencial. Araújo e Zucchi (2006) mediram o acúleo de cinco espécies de moscas-das-frutas oriundas de vários hospedeiros e de várias regiões, entre elas *A. obliqua* e constataram que há variação no tamanho do ápice do acúleo de indivíduos dessa espécie obtidos de frutos de taperebá na Amazônia, corroborando os resultados de grande variabilidade genética nesta região.

Os haplótipos H1, H3, H6 e H16 são os mais frequentes e estão muito próximos entre si, o que sugere que são os mais ancestrais e presentes em todas as localidades amostradas no estado do Amapá. Os haplótipos mais distantes são na maioria únicos e essas características sugerem que sejam derivados (Figura 4).

Em geral, populações de adultos de moscas-das-frutas tendem a permanecer em locais com disponibilidade de água, alimentos, sítios de oviposição e refúgios, não se conhecendo casos de migração de *Anastrepha*, apenas movimentos não-migratórios relacionados ao forrageamento de determinado recurso, interrompidos quando o recurso é encontrado (SUGAYAMA; MALAVASI, 2000). Porém, o transporte de frutos de um local para o outro por habitantes e produtores rurais pode ser a causa da dispersão, migração e estabelecimento de populações de *A. obliqua* para outras regiões mais distantes do estado do Amapá, onde o deslocamento pela própria capacidade de voo do inseto seria improvável.

5 CONCLUSÕES

Pode se verificar nas análises genéticas que as populações de *A. obliqua* de todas as localidades amostradas no estado do Amapá apresentam alta diversidade. Esta diversidade pode ser mantida provavelmente devido à conservação das florestas dessa região que possibilita a existência de uma grande diversidade de hospedeiros. A ausência de fragmentação, aliada ao movimento dos habitantes, pode favorecer a manutenção do elevado fluxo gênico entre as populações. Estudos adicionais com outros marcadores moleculares poderão ajudar a refinar nossa análise e são necessários para melhor compreensão da biologia e da dinâmica populacional de *A. obliqua* no Amapá.

AGRADECIMENTOS

À Camila Ribeiro Lima, Luana dos Santos Pinheiro e Maria do Socorro Miranda de Sousa, pelo apoio na obtenção dos exemplares de moscas para os estudos. Ao Carlos Alberto Moraes, pelo auxílio nas coletas. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela bolsa de mestrado concedida ao primeiro autor. À Rede Amazônica de Pesquisas sobre Moscas-das-frutas, pelo financiamento dos estudos. À Embrapa Amapá, pela infraestrutura para a realização da pesquisa. À Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC pela logística concedida para a realização das análises moleculares. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa concedida a Ricardo Adaime.

REFERÊNCIAS

ALUJA, M. Bionomics and management of *Anastrepha*. **Annual Review of Entomology**, v.39, p.155-178, 1994.

ALUJA, M.; CABRERA, M.; RIOS, E.; GUILLÉN, J.; CELEDONIO, H.; ENDRICHS, J.; LIEDO, P. A survey of the economically important fruit flies (Diptera: Tephritidae) present in Chiapas and a few other fruit growing regions in Mexico. **Florida Entomologist**, v.70, p.320-329. 1987.

ARAÚJO, E.L.; ZUCCHI, R.A. Measurement of the aculeus for the characterization of Five *Anastrepha* species of the *fraterculus* group (Diptera: Tephritidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.35, p.329-337, 2006.

AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. London: Chapman & Hall, 1994. 334p.

AYALA, F.J.; WETTERER, J.K. LONGINO, J.T. HARTL, D.L. Molecular phylogeny of *Azteca ants* (Hymenoptera, Formicidae) and the colonization of Cecropia trees. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.5, p.423-428, 1996.

BANDELT, H.J.; FORSTER, P.; FORSTER, M.; ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biological and Evolution**, v.35, p.38-45. 2008

CARVALHO, R.S.; NASCIMENTO, A.S.; FERNANDES, E.B. Dados Biológicos de *Anastrepha obliqua* Macquart (Diptera:Tephritidae) em Manga. Anais da **Sociedade Entomológica do Brasil**, v.27, n.3, p.469-472, 1998.

CARVALHO, R.S.; SOARES FILHO, W.S.; RITZINGER, R. Umbu-cajá como repositório natural de parasitoide nativo de moscas-das-frutas. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.45, n.10, p.1222-1225. 2010.

CATERINO, M.S.; CHO, S.; SPERLING, F.A.H. The current state of insect molecular systematics: A thriving tower of Babel. **Annual Review of Entomology**, v.45, p.1-54, 2000.

CHIOTIS, M.; JERMIIN, L.S.; CROZIER, R.H. A molecular framework for the phylogeny of the ant Subfamily Dolichoderinae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.17, p.108-116, 2000.

CLARY, D.O.; WOLSTENHOLME, D.R. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: Nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. **Journal of Molecular Evolution**, v.22, p.252-271, 1985.

EPSKY, N.D.; KENDRA, P.E; HEATH, R.R. Development of lures for detection and delimitation of invasive *Anastrepha* fruit flies. 2003, p. 84-89 In KLASSEN, W.; COLON, W.; LUGO W.I. (eds.), Proc. of the 39th **Annual Meeting of the Caribbean Food Crops Society**, July 2003, Grenada.

FERREIRA, H.J.; VELOSO, V.R.S.; NAVES, R.V.; BRAGA FILHO, J.R. Infestação de moscas-das-frutas em variedades de manga (*Mangifera indica* L.) no estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.33, n.1, p.43-48, 2003.

FOOTE, R.H.; BLANC, F.L.; NORRBOM, A.L. **Handbook of the fruit flies (Diptera: Tephritidae) of America North of Mexico**. Comstock Publishing Associates, Ithaca. 1993. 571p.

HALL, T.A. **BioEdit**: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, v.41, p.95-98 1999.

HERNÁNDEZ-ORTIZ, V.; ALUJA, M. Lista preliminar de espécies del genero Neotropical *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) con notas sobre su distribución y plantas hospederas. **Folia Entomologica del Mexico**, v.88, p.89-105, 1993.

IBGE. Atlas Nacional do Brasil: Território Brasileiro, divisão política. 2011. Disponível em:ftp://geoftp.ibge.gov.br/atlas/atlas_nacional_do_brasil_2010/2_territorio_e_meio_ambiente/atlas_nacional_do_brasil_2010_pagina_34_territorio_brasileiro.pdf. Acesso em 22.04.2012.

KIMURA. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v.16, p.111-120, 1980.

MCPHERON, B.A.; HAN, H.Y.; SILVA, J.G.; NORRBOM, A.L. Phylogeny of the genus *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based upon 16S rRNA mitochondrial DNA sequences. In: ALUJA, M.; NORRBOM, A. L. (Ed.). **Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution and behavior**. Boca Raton: CRC Press. 1999, p.343-361.

ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DEL BARRIO, J.C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. Current Released Version, Universitat de Barcelona. 2006, 324p.

RUIZ-ARCE, R.. **A phylogeographic study of *Anastrepha obliqua* and *A. ludens* (diptera: tephritidae)**. Tese (doutorado), Departemnt of Entomology, The Pennsylvania State University, University Park, PA, EUA. 2009, 192p.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEY, M.; KUMAR, S. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biological and Evolution**, v.24, p.1596-1599, 2007.

SAMBROOK, J.; FRISTCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**. A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989, 417p.

SCARPASSA, V.M. et al. Genetic divergence in mitochondrial DNA of *Anopheles nuneztovani* (Diptera, Culicidae) from Brazil and Colombia. **Genetic Molecular and Biologic**, v.23, p.71-78, 2000.

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 sequence of the mitochondrial cytochrome oxidase I. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.30, p.565-573, 2001.

SILVA, R.A.; DEUS, E.G.; PEREIRA, J.D.B.; JESUS, C.R.; SOUZA-FILHO, M.F.; ZUCCHI, R.A. Conhecimento sobre moscas-das-frutas no Estado do Amapá. In Silva, R.A.; Lemos, W.P.; Zucchi, R.A. (eds) **Moscas-das-frutas na Amazônia brasileira: diversidade, hospedeiros e inimigos naturais**. Macapá: Embrapa Amapá, 2011a. p.225-236.

SILVA, T.G.A. Caracterização Morfométrica e molecular de *Anastrepha bistrigata* Bezzi e *Anastrepha striata* Schiner (Diptera: Tephritidae). Dissertação (mestrado), Escola Superior de agricultura Luiz de Queiroz, 2008, 65p. Piracicaba.

STEWART, J.B.; BECKENBACH, A.T. Insect mitochondrial genomics 2: the complete mitochondrial genome sequence of a giant stonefly, *Pteronarcys princeps*, asymmetric directional mutation bias, and conserved plecopteran A+T - region elements. **Genome**, v.49, p.815-824, 2006.

SUGAYAMA, R.L.; MALAVASI, A. Ecologia Comportamental. In Malavasi A, Zucchi RA (eds) **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000 p.103-108.

ZUCCHI, R.A. Espécies de *Anastrepha*, sinônimas, plantas hospedeiras e parasitóides. In Malavasi A, Zucchi RA (eds) **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000, p.41-48.

ZUCCHI, R.A. **Fruit flies in Brazil - *Anastrepha* species and their hosts plants**, 2011. Disponível em: <www.lef.esalq.usp.br/anastrepha/> Acesso em 22.04.2012.

ZUCCHI, R.A.; SILVA R.A.; DEUS E.G. Espécies de *Anastrepha* e seus hospedeiros na Amazônia brasileira. In SILVA, R.A.; LEMOS, W.P.; ZUCCHI R.A. (eds) **Moscas-das-frutas na Amazônia brasileira: diversidade, hospedeiros e inimigos naturais**. Macapá: Embrapa Amapá, 2011. p.53-70.

WETTERER, J.K.; SCHULTZ, T.R.; MEIER, R. Phylogeny of fungus-growing ants (Tribe Attini) based on mtDNA sequence and morphology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.9, n.1, p.42-47. 1998.

WU, Y.; MACPHERON, B.A.; WU, J.J.; LI, Z.H. Genetic relationship of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) inferred from mitochondrial DNA. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, **Insect Science**, v.00, p.1-10. 2011.