

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE
Liriomyza sativae BLANCHARD (DIPTERA: AGROMYZIDAE)

por

ELAINE CRISTINA BATISTA FERREIRA

(Sob Orientação do Professor Valdir de Queiroz Balbino)

RESUMO

A ordem Diptera destaca-se por ser uma das principais ordens que possui insetos com hábito alimentar do tipo minador, onde a principal família com essa característica é Agromyzidae, representada principalmente nos gêneros *Liriomyza* e *Agromyza*. No Brasil, as espécies *Liriomyza trifolii* (Burgess), *L. sativae* (Blanchard) e *L. huidobrensis* (Blanchard) apresentam importância econômica e ocorrem naturalmente em quase todos os estados, infestando cerca de 14 famílias de plantas, principalmente Solanaceae, Cucurbitaceae, Asteraceae e Fabaceae. Existe uma notável similaridade morfológica entre as espécies que compõem o gênero *Liriomyza*, vários estudos têm levantado à hipótese da existência de um complexo de espécies. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo realizar a identificação molecular de sete populações pertencentes ao gênero *Liriomyza* localizadas nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil, através do marcador molecular COX I, e analisar a divergência genética existente entre elas. Foi possível observar que o valor do índice de fixação F_{ST} foi baixo. Através da rede de haplótipos foi possível detectar a presença de 14 haplótipos onde o haplótipo H1 foi o mais frequente devido a sua presença em 81 indivíduos distribuídos entre as sete populações. Uma árvore filogenética gerada através do

método de máxima verossimilhança mostrou a presença de um único clado para *L. sativae*, sendo demonstrado que as populações estudadas apresentam elevado grau de similaridade genética.

PALAVRAS-CHAVE: Mosca minadora, citocromo oxidase I, identificação, genética de populações.

GENETIC STRUCTURE OF NATURAL POPULATIONS

Liriomyza sativae BLANCHARD (DIPTERA: AGROMYZIDAE)

by

ELAINE CRISTINA BATISTA FERREIRA

(Under the direction of Professor Valdir de Queiroz Balbino- UFPE)

ABSTRACT

The order Diptera is notable for being one of the main orders that have insects with food habits of miner type, where the main feature is that family Agromyzidae, represented mainly in the genera *Liriomyza* and *Agromyza*. In Brazil, the species *Liriomyza trifolii* (Burgess), *L. sativae* (Blanchard) and *L. huidobrensis* (Blanchard) have economic importance and occur naturally in almost all states, infesting about 14 plant families, mainly Solanaceae, Cucurbitaceae, Asteraceae and Fabaceae. There is a remarkable morphological similarity among species that comprise the genus *Liriomyza*, several studies have raised the hypothesis of a species complex. In this context, the present study aimed to perform molecular identification of seven populations of the genus *Liriomyza* located in the Northeast and Southeast regions of Brazil, through molecular marker COX I, and analyze the genetic diversity existing among them. It was observed that the value of the fixation index F_{ST} was low. Through haplotype network was possible to detect the presence of 14 haplotypes where the H1 haplotype was the most common due to its presence in 81 individuals distributed among the seven populations. A phylogenetic tree generated by maximum likelihood method showed the presence of a single clade to *L. sativae*, it was demonstrated that the populations studied showed a high degree of genetic similarity.

KEY WORDS: Fly miner, cytochrome oxidase I, identification, population genetics.

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE
Liriomyza sativae BLANCHARD (DIPTERA: AGROMYZIDAE)

por

ELAINE CRISTINA BATISTA FERREIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Entomologia Agrícola, da
Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau
de Mestre em Entomologia Agrícola.

RECIFE - PE

Fevereiro – 2014

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE
Liriomyza sativae BLANCHARD (DIPTERA: AGROMYZIDAE)

por

ELAINE CRISTINA BATISTA FERREIRA

Comitê de Orientação:

Valdir de Queiroz Balbino – UFPE

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE
Liriomyza sativae BLANCHARD (DIPTERA: AGROMYZIDAE)

por

ELAINE CRISTINA BATISTA FERREIRA

Orientador:

Valdir de Queiroz Balbino – UFPE

Examinadores:

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

Manuela Barbosa Rodrigues de Souza – UFPE

Elton Lucio de Araujo – UFERSA

DEDICATÓRIA

A Deus, por todas as bênçãos recebidas.

A minha família, em especial a minha mãe Adelice Batista Alves, pelo amor, dedicação e valiosos ensinamentos que me tornaram a pessoa que eu sou. Com amor dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação em Entomologia Agrícola.

À Universidade Federal de Pernambuco que possibilitou desenvolvimento deste trabalho.

Ao corpo docente do Programa de Pós Graduação em Entomologia Agrícola da UFRPE.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Dr. Valdir de Queiroz Balbino, pelos valiosos ensinamentos, paciência e incentivo.

Ao meu Coorientador Dr. Herbert Siqueira, pela colaboração nas coletas de algumas populações de insetos utilizados nesse trabalho e por me incentivar a trabalhar com Biologia Molecular, que foi uma experiência muito significativa em minha vida.

Ao Dr. Elton Araujo, por ter cedido espécimes para o desenvolvimento deste trabalho e pela disponibilidade.

A minha mãe Adelice Batista Alves, pelo amor, dedicação e apoio em todos os momentos. Pessoa que torna meus dias mais suaves.

A minha irmã Aline Batista Ferreira, pelo companheirismo.

A minha família, avó, tios(as) e primos(as), pelo total apoio durante todos os momentos da minha vida.

Ao meu grande amigo e namorado Moisés Freitas pelo apoio e paciência. E por me mostrar a importância de acreditar em nós mesmos.

A todos meus amigos do LABBE (Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva) da UFPE, Patrícia Rocha, Nádia Aragão, Marcus Batista, Marcus Cardoso e Bruno Feitosa. Em

especial César Júnior, Karla Sombra, Lidiane Gomes e Carlos Santiago muito obrigada pela disponibilidade e ajuda na realização deste trabalho.

À Laís Barreto e Juraci Marcos, pelo acolhimento e confiança quando cheguei a Recife.

À Camila e Rita Pedroza, pelo companheirismo diário.

À Cecília Sanguinetti, Vaneska Barbosa, Kamilla Dutra pelo carinho e amizade, e aos demais colegas do Mestrado em Entomologia Agrícola 2012.1. Nunca me esquecerei dos momentos que passamos juntos!

A todas as pessoas que participaram da minha vida, direta ou indiretamente, saibam que vocês são de extrema importância para mim.

Obrigada a todos!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	ix	
CAPÍTULOS		
1 INTRODUÇÃO.....	01	
LITERATURA CITADA.....	08	
2 ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>Liriomyza Sativae</i> Blanchard (DIPTERA: AGROMYZADAE).....		14
RESUMO.....	15	
ABSTRACT.....	16	
INTRODUÇÃO.....	17	
MATERIAL E METODOS.....	18	
RESULTADOS.....	21	
DISCUSSÃO.....	23	
AGRADECIMENTOS.....	26	
LITERATURA CITADA.....	26	

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. Mosca-minadora, *Liriomyza* spp

A família Agromyzidae inclui importantes espécies de dípteros minadores, com sua origem datada no Paleoceno através de informações obtidas a partir de icnofósseis da região sudeste do Montana (EUA) (Winkler *et al.* 2010). Dentro desta família, o gênero *Liriomyza* destaca-se do ponto de vista agrônomico, constituindo pragas em ornamentais e hortícolas. Este gênero apresenta 300 espécies, contudo apenas 23 espécies são de importância econômica, sendo cinco destas polífagas: *Liriomyza trifolii* (Burgess); *L. bryoniae* (Kaltenbach); *L. huidobrensis* (Blanchard); *L. sativae* (Blanchard); *L. strigata* (Meigen) (Parrella, 1987). A espécie *L. sativae* é uma das principais espécies por causar danos a plantas das famílias Cucurbitaceae, Fabaceae e Solanaceae (Carpinera, 2001). Estes insetos possuem elevada taxa de fecundidade, multivoltinos e desenvolvem facilmente resistência aos inseticidas utilizados no seu controle (Parrella & Keil, 1984).

As fêmeas de *Liriomyza* realizam a oviposição tanto na face adaxial quanto abaxial das folhas, causando injúria em toda estrutura foliar. No entanto, os comportamentos de alimentação e oviposição são idênticos, independente do hospedeiro. Seus ovos possuem cerca de 0,28 mm de comprimento x 0,15 mm de diâmetro, coloração esbranquiçada e ligeiramente translúcida (Parrella, 1987). A larva é do tipo vermiforme e de coloração pálida nos primeiros instares. No final do ciclo, torna-se amarela e atinge cerca de 3 mm de comprimento. O desenvolvimento larval dura de quatro a seis dias, de acordo com a temperatura do ambiente. Ao passar por três instares desenvolvem-se no tecido foliar, onde à medida que se alimenta, origina as galerias ou minas. A pupa possui coloração inicialmente amarelada e adquire tonalidade marrom próximo à emergência do adulto e localiza-se na face abaxial das folhas ou

no solo. Quando a mosca chega à fase adulta, possui coloração predominante preta e mede aproximadamente 2 mm de comprimento (Parrella & Keil, 1984).

Em um estudo realizado por Sombra *et al.* (2011), foi avaliada a preferência de oviposição desta mesma espécie de mosca minadora em dez variedades comerciais de meloeiro e observou-se que a pilosidade presente nas folhas influencia o desenvolvimento deste inseto. Em plantas de meloeiro sob condições de laboratório, Araújo *et al.* (2013) concluíram que o ciclo biológico de *L. sativae* é de $15,9 \pm 0,04$ dias (ovo-adulto). Lima *et al.* (2009), mantiveram populações de *L. sativae* em feijão caupi (*Vigna unguiculata*) para estudar o efeito da temperatura e umidade relativa do ar no desenvolvimento desta espécie em condições de laboratório. De acordo com as exigências térmicas constatadas, foi possível estimar a ocorrência de 24,5 gerações anuais; com base nos resultados obtidos, observou-se que a temperatura de 30°C é a melhor para o desenvolvimento imaturo desta espécie em feijão caupi.

1.1 Distribuição Geográfica

Na família Agromyzidae o gênero *Liriomyza* é o que possui maior número de hospedeiros (Wiegmann, 2007). Das espécies consideradas polífagas, duas são nativas da Europa (*L. bryoniae* e *L. strigata*) e três das Américas (*L. trifolii*, *L. sativae* e *L. huidobrensis*) (Spencer, 1973). *L. trifolii*, *L. sativae* e *L. huidobrensis* têm causado maiores preocupações, em decorrência do alto nível de polifagia e pelo aumento de ocorrência em novas áreas geográficas (Murphy & Lasalle, 1999). Um dos fatores que contribui para que isso aconteça é a comercialização de hortaliças e plantas ornamentais (EFSA, 2012). O primeiro relato de explosão populacional de *L. sativae* ocorreu em 1948 na Flórida (Spencer, 1973) e desde então, sua área de distribuição têm se ampliado.

Dados da EPPO (sigla em inglês para Organização Europeia e do Mediterrâneo para Proteção de Plantas) que atualiza a distribuição geográfica de espécies do gênero *Liriomyza*,

mostram que *L. sativae* está presente em países da África, na América do Norte, América Central e América do Sul, Ásia, Oceania e, de forma restrita, na Europa (EPPO, 2012). Parrella e Keil (1984) apontaram que as razões para a dispersão das moscas minadoras foram: confusão taxonômica, falha de procedimentos de quarentena, falta de estudos básicos biológicos e ecológicos e o uso indiscriminado de insecticidas.

No Brasil o primeiro registro de *L. sativae* (como *Liriomyza guytona*) foi na década de 1960, no estado de São Paulo (Nakano, 1967). Segundo Fernandes (2004), a mosca minadora há bastante tempo, é uma praga importante nas áreas onde é cultivado o meloeiro no Nordeste. No entanto, é possível que a distribuição das moscas minadoras no Brasil seja bem mais abrangente do que está documentado, devido principalmente à escassez de taxonomistas especializados nesse grupo de insetos. Esse fato dificulta a realização de estudos de levantamento e de flutuação populacional, ações estas fundamentais para o melhor conhecimento e manejo do inseto (Lima, 2012).

1.2 Danos e importância econômica

Entre as espécies de moscas minadoras, *L. trifolii* merece destaque por possuir hospedeiros em 25 famílias botânicas distintas, dentre as quais se destacam: Apiaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Leguminosae, Poaceae e Solanaceae. A espécie *L. sativae*, por sua vez, ataca pelo menos nove famílias botânicas com especial preferência pelas plantas das famílias Solanaceae, Cucurbitaceae, Asteraceae, Fabaceae (Spencer, 1990).

As injúrias causadas pelas moscas minadoras depreciam a qualidade dos vegetais e com isso o valor comercial é reduzido, causando sérios prejuízos ao produtor. Parrella (1987) concluiu que esta praga pode causar danos às culturas de várias maneiras: destruição de plantas; reduções na produtividade das culturas causadas pelas minas na folhas; e redução da qualidade e estética do fruto e de plantas ornamentais. No Brasil, os Estados do Rio Grande do Norte, Ceará e Bahia são responsáveis por 94% da produção nacional de melão. No entanto,

devido ao ataque da mosca minadora, já foram detectadas perdas de até 40% da produção (Fernandes, 2004). Segundo Araújo (2007), essa praga deve ser considerada como o principal entrave para o cultivo do meloeiro na atualidade, sendo preocupação constante em todas as áreas produtoras.

A presença das minas causadas pela mosca resulta na redução da área foliar e na diminuição da taxa de fotossíntese da planta. Conseqüentemente, ocorre perda na produção e também na qualidade dos frutos, devido à redução do teor de sólidos solúveis (°Brix). Além disso, em altas infestações, as folhas tornam-se ressecadas e quebradiças, sendo facilmente arrancadas pelo vento ou manuseio. As minas também podem atuar como portas de entrada para patógenos foliares oportunistas, capazes de prejudicar ainda mais o desenvolvimento do meloeiro (Araújo, 2007).

Espécies ornamentais, que são muito infestadas e conhecidas por facilitar a dispersão dessa praga, incluem o crisântemo, calêndula e gérbera (Stegmaier, 1966). Apesar da importância econômica da mosca minadora para várias culturas no Brasil, o número de pesquisas relacionadas a esse inseto ainda é reduzido, principalmente na região Nordeste (Parra, 2000). Portanto é necessário o desenvolvimento de trabalhos com a finalidade de incrementar o manejo desta praga.

1.2.1 Métodos de controle

A identificação precisa das espécies de *Liriomyza sp.* passou a ser de primordial relevância para a definição de métodos de controle adequados, uma vez que o nível de resistência aos diferentes inseticidas varia entre as espécies (Tokumaru *et al.* 2005). Segundo Sales Júnior *et al.* (2004) as medidas de controle adotadas devem seguir os padrões do manejo integrado de pragas, tais como: realização do plantio de mudas saudáveis; proteger a planta com tecido não tecido (TNT); utilizar lona plástica amarela impregnada com óleo vegetal no

plântio; realizar a aplicação de inseticidas apenas quando a praga atingir o nível de dano e destruir os restos culturais.

Também pode ocorrer o significativo controle das moscas minadoras pela ação de inimigos naturais, principalmente as vespas parasitóides, e a ausência desses agentes de controle podem resultar em altas densidades populacionais da praga (Guimarães *et al.* 2009). Contudo, o controle químico é o método mais comum para o controle de espécies do gênero *Liriomyza* em várias culturas de importância econômica, sendo utilizados inseticidas de largo espectro: Abamectina, Ciromazina, Tiametoxam, Espinosade e Clorfenapir (Cox *et al.* 1995, Weintraub & Horowitz, 1995, Lara *et al.* 2002; Weintraub, 2003; Ferguson, 2004; Araujo *et al.* 2012). Em meloeiro, apenas três inseticidas são registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para uso no controle da mosca minadora, a saber: cloridato de cartap; ciromazina; e abamectina (Agrofit, 2011). O número reduzido de produtos autorizados para o controle da mosca minadora dificulta a rotação de princípios ativos, criando um cenário propício ao desenvolvimento de resistência (Guimarães *et al.* 2009; Umeda *et al.* 2011).

2. Identificação e estudos moleculares

A correta identificação de um inseto de interesse econômico é premissa básica para a solução de qualquer problema entomológico. Ela facilita a busca e a obtenção de toda a informação bibliográfica previamente existente sobre o tema (Fujihara, 2011). Na ordem Diptera tem sido relatada a ocorrência de espécies crípticas, ou seja, que se assemelham em sua morfologia e são distintas em aspectos biológicos, podendo assim fazer parte de um complexo de espécies (Rothfels *et al.* 1979).

Devido à dificuldade de identificação morfológica, técnicas alternativas, como as que envolvem análise de DNA, têm se mostrado úteis para estudos de identificação de espécies crípticas, pois disponibilizam informações não somente para a separação das espécies como

também para estudos de genética de populações e filogenia (Beebe & Cooper, 2000; Norris, 2002). Para realização de inferências filogenéticas têm sido utilizados diferentes genes mitocondriais por possuírem características como: ampla distribuição entre os metazoários; alto número de cópias por célula; baixos níveis de polimorfismo ancestral; taxas de mutação diferentes entre espécies; não sofrer recombinação; e apresentar uma herança predominantemente materna (Azeredo 2005). O DNA *barcode* tem sido proposto como uma ferramenta universal para identificação da diversidade biológica. Este método de identificação foi baseado a partir de um conjunto de informações a partir de um fragmento de cerca de 688 pares de base de sequências de DNA do gene citocromo oxidase I de diferentes espécies. Diferentes estudos mostraram que o DNA *barcode* é um sistema de identificação universal eficaz para ampla variedade de organismos metazoários (Hebert *et al.* 2003, 2004; Barrett e Hebert, 2005).

Muitos grupos de insetos de importância agrícola fazem parte de complexos de espécies, fazendo com que a identificação através da taxonomia clássica seja difícil até mesmo para especialistas (Busvine 1980, Della Torre *et al.* 2002, Clark *et al.* 2005). Portanto, através do DNA *barcode* diferentes espécies de insetos praga, inimigos naturais, espécies endêmicas, não endêmicas, e em qualquer estágio de desenvolvimento estão sendo identificadas de forma rápida e segura (Garipey *et al.* 2007, Jenkins *et al.* 2012).

Em virtude da grande quantidade de hospedeiros comuns e à similaridade morfológica entre as espécies, a taxonomia dos agromizídeos polípagos, principalmente àqueles do gênero *Liriomyza*, mostra-se bastante confusa (Parrella, 1982). Foram realizados estudos a respeito da filogeografia mitocondrial de *L. sativae* de várias partes do mundo (América do Norte, América do Sul, América Central, Ásia e Oriente Médio). Os resultados mostraram que esta espécie abriga clados distintos, indicando a presença de espécies crípticas (Scheffer e Lewis, 2005).

Ao longo das décadas foram apresentados relatos sobre o status taxonômico em *L. sativae* (Parrella, 1982). Esta espécie foi redescrita ao menos sete vezes a partir de diferentes locais e hospedeiros, devido à sua semelhança morfológica com outras espécies do mesmo gênero, ocasionando inúmeras dificuldades na identificação taxonômica, aspectos biológicos e ecológicos desta espécie (Spencer 1973, Parrella e Keil, 1984, Spencer & Steyskal 1986). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo realizar a identificação molecular de sete populações pertencentes ao gênero *Liriomyza* localizadas nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil através do marcador molecular COX I e analisar a divergência genética existente entre estas populações.

Literatura Citada

- Agrofit. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. 2011.** Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 3 Set. 2013.
- Araujo, E.L., D.R.R. Fernandes, L.D. Geremias, A.C. Menezes Netto & M.A. Filgueira. 2007.** Mosca minadora associada à cultura do meloeiro no semi-árido do Rio Grande do Norte. *Caatinga*, 20: 210-212.
- Araujo, E.L., E.M. Costa, E.R. Moura Filho, C.H.F. Nogueira & M.R.D Santos. 2012.** Efeito de inseticidas sobre a mosca minadora (Diptera: Agromyzidae), quando aplicados durante a fase de ovo. *Agropecuária Científica no Semiárido*. 8: 18-22.
- Araujo, E.L., C.H.N. Feitosa, A.C.M. Netto & C.E.S. Bezerra. 2013.** Biological aspects of the leafminer *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) on melon (*Cucumis melo* L.). *Cienc. Rural*, 43: 579-582.
- Azeredo, A.M.L. 2005.** O código de barras da vida baseado no DNA “Barcoding of Life”: Considerações e perspectivas. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. SP, CBMEG UNICAMP, 14 p. (Comunicado Técnico).
- Barrett, R.D.H. & P.D.N. Hebert. 2005.** Identifying spiders through DNA barcodes. *J. Zool.* 83: 481- 491.
- Beebe, N.W. & R.D. Cooper. 2000.** Systematics of malaria vectors with particular reference to the *Anopheles punctulatus* group. *Int. J. Parasitol. Parasites. Wildl.* 30: 1-17.
- Busvine, J.R. 1980.** Cryptic species of insect disease vectors and their importance. *Endeavour*. 4: 108-112
- Capinera, J.L. 2001.** Vegetable Leafminer, *Liriomyza sativae* Blanchard (Insecta: Diptera: Agromyzidae). University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, EDIS. Disponível em <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN50700.pdf>. Acesso em: 18 Jan. 2014.
- Clark, A.R., K.F. Armstrong, A.E. Carmichael, J.R.S. Raghu, G.K. Roderick & D.K. Yeates. 2005.** Invasive phytophagous pests arising through a recent tropical evolutionary radiation: the *Bactrocera dorsalis* complex of fruit Flies. *Annu. Rev. Entomol.* 50: 293-319.
- Cox, D. L., M.D. Remick, J.A. Lasota & R.A. Dybas 1995.** Toxicity of avermectins to *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) larvae and adults. *J. Econ. Entomol.* 88: 1415-1419.
- Della Torre, A., C. Costantini, N.J. Besansky, A. Caccone, V. Petrarca, J.R. Powell & M. Coluzzi. 2002.** Molecular and ecological aspects of incipient speciation within *Anopheles gambiae*: the glass is half full. *Environ. Sci.* 289: 115-117.
- EFSA- European Food Safety Authority. 2012.** Scientific Opinion on the risks to plant health posed by *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) and *Liriomyza trifolii* (Burgess) in

the EU territory, with the identification and evaluation of risk reduction options. Italy, EFSA Journal, 190 p. (Comunicado Técnico).

- Ferguson, J.S. 2004.** Development and stability of insecticide resistance in the leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) to cyromazine, abamectin, and spinosad. J. Econ. Entomol. 97: 112-119.
- Fernandes, O.A. 2004.** Melão: campo minado. Pelotas, Cultivar, 2 p. (Comunicado Técnico 23).
- Fujihara, R.T., L.C. Forti, M.C. Almeida & E.L.L. Baldin. 2011.** Insetos de importância econômica: guia ilustrado para identificação de famílias. Botucatu, FEPAF Editora, 391p.
- Garipey, T.D., U. Kuhlmann, C. Gillott & M. Erlandson. 2007.** Parasitoids, predators and PCR: the use of diagnostic molecular markers in biological control of Arthropods. J. Appl. Entomol. 131: 225–240.
- Guimarães, J.A., M.M. Oliveira Filho, V.R. Liz & E.L. Araujo. 2009.** Biologia e manejo de mosca minadora no meloeiro. Brasília, Embrapa Hortaliças, 9 p. (Comunicado Técnico 77).
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball & J.R. Dewaard. 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 270: 313-321.
- Hebert, P.D.N., M.Y. Stoeckle, T.S. Zemplak & C.M. Francis. 2004.** Identification of birds through DNA barcodes. Plos Biol. 2: 1657–1663.
- Jenkins, T.A., J.L. Chapman & O.L. Micallef. 2012.** Molecular techniques for the detection and differentiation of host and parasitoid species and the implications for fruit fly management. J. Insects. 3: 763–788.
- Lara, R.I.R., N.W. Periotto, J.C.C. Santos, A. Selegatto & E.S. Luciano. 2002.** Avaliação de thiamethoxam 250WG no controle de *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard, 1926) e de sua seletividade sobre himenópteros parasitóides em cultura de batata (*Solanum tuberosum* L.). Arq.Inst. Biol. 69: 57-61.
- Lima, T.C.C., L.D. Geremias & J.R.P. Parra. 2009.** Efeito da temperatura e umidade relativa do ar no desenvolvimento de *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) em *Vigna unguiculata*. Neotrop. Entomol. 38: 727- 733.
- Lima, M.A.A. 2012.** Resistência de genótipos de meloeiro à mosca- minadora *Liriomyza sativae* (Blanchard, 1938) (Diptera: Agromyzidae). Tese de Doutorado, ESALQ-USP, São Paulo, 121 p.
- Murphy, S.T. & J. Lasalle. 1999.** Review article: balancing biological control strategies in the IPM of new world invasive *Liriomyza* leafminers in field vegetable crops. Bioc. News Inf. 20: 91-104.
- Norris, D.E. 2002.** Genetic markers for study of the anopheline vectors of human malaria. International Journal for Parasitology, 32: 1607-1615.

- Parra, J.R.P. 2000.** A biologia de insetos e o manejo de pragas: criação em laboratório à aplicação em campo, Piracicaba. 1-29 p.
- Parrella, M.P. 1982.** A review of the history and taxonomy of economically important serpentine leafminers (*Liriomyza* spp.) in California (Diptera: Agromyzidae). Pan- Pacif. Entomol. 58: 302-308.
- Parrella, M.P. & C.B. Keil. 1984.** Insect pest management: the lesson of *Liriomyza*, *Bull. Entomol. Soc. Am.* 30: 22- 25.
- Parrella, M.P. 1987.** Biology of *Liriomyza*. *Annual Review of Entomology*, Stanford. 32: 201-204.
- Reitz, S.R., Gao, Y. & Lei, Z. 2013.** Insecticide Use and the Ecology of Invasive *Liriomyza* Leafminer Management. Disponível em <<http://www.intechopen.com/download/get/type/pdfs/id/42154>> Acesso em: 18 Jan. 2014.
- Rothfels, K.H. 1979.** Chromosomal variability and speciation in blackflies. *Symposia of the Royal Entomological Society of London. Antarct. Sci.* 10: 207-224.
- Sales Júnior, R. 2004.** Tecnologia de Produção HHF& Citrus. 6.ed. p.18-21.
- Scheffer S.J. & M.L. Lewis. 2001.** Two nuclear genes confirm mitochondrial evidence of cryptic species within *Liriomyza huidobrensis*. *Annals of the Arch. Insect Biochem. Physiol.* 94, 648–653.
- Scheffer, S.J. & M.L. Lewis. 2005.** Mitochondrial phylogeography of vegetable pest *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae): divergent clades and invasive populations. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98: 181-186.
- Sombra. K.D.S. 2011.** Reação de Cultivares de Meloeiro á mosca minadora. Dissertação de Mestrado, UFERSA, Mossoró, 56 p.
- Spencer, K.A. 1973.** Agromyzidae (Diptera) of Economic Importance. *Series Entomologica.* Netherlands. 418p.
- Spencer, K.A. & G.C. Steyskal. 1986.** Manual of the Agromyzidae (Diptera) of the United States. U. S. Dept. of Agric., A. R. S., Agriculture Handbook. 638p.
- Spencer, K.A. 1990.** Host Specialization in the World Agromyzidae (Diptera). *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.* 444 p.
- Stegmaier Júnior, C.E. 1966.** Host plants and parasites of *Liriomyza trifolii* in Florida (Diptera: Agromyzide). *Florida Entomology.* 49: 75-80.
- Tokumaru, S., H. Kurita M. Fukui & Y. Abe. 2005.** Insecticide susceptibility of *Liriomyza sativae*, *L. trifolii*, and *L. bryoniae* (Diptera: Agromyzidae). *Japanese J. Appl. Entomol.* 49: 1–10.

- Umeda, K.; G. Gal & B. Strickland. 2011.** Leafminer control in cantaloupe. Disponível em <http://ag.arizona.edu/pubs/crops/az1101/az1101_18.html> Acesso em: 19 Jan. 2014.
- Winkler, I.S., C.C. Labandeira, T. Wappler & P. Wilf. 2010.** Distinguishing Agromyzidae (Diptera) leaf mines in the fossil record: new taxa from the Paleogene of North America and Germany and their evolutionary implication. *J. of Paleontology*. 84: 935-954.
- Weintraub, P.G. & A.R. Horowitz. 1995.** The newest leafminer pest in Israel, *Liriomyza huidobrensis*. *Phytoparasitica* 23: 177-184.

CAPÍTULO 2

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Liriomyza sativae* BLANCHARD (DIPTERA: AGROMYZIDAE)

ELAINE C. B. FERREIRA¹, MOISES T. S. FREITAS², KARLA D. S. SOMBRA¹, HERBERT A. A.
SIQUEIRA¹, ELTON L. DE ARAUJO³, VALDIR Q. BALBINO²

¹Departamento de Agronomia – Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco
Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil; ²Departamento de
Genética – Universidade Federal de Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brasil; ³Departamento de Ciências
Vegetais – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Km 47, BR 110, 59625-900, Mossoró, RN,
Brasil.

Ferreira, E.C.B., M.T.S. Freitas, K.D.S. Sombra, H.A.A. Siqueira, E.L.V. Araujo, Balbino, V.Q.
Estrutura genética em populações naturais de *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae). A
ser submetido

RESUMO- As moscas-minadoras da espécie *Liriomyza sativae* são pragas em diversas hortaliças em todo o mundo. Estes dípteros possuem ciclos de vida rápido, alta taxa de crescimento populacional resultando em expressivas perdas econômicas, além de possuir uma alta capacidade de adquirir resistência a inseticidas tornando seu controle difícil. Análises moleculares têm se mostrado úteis para estudos de identificação de espécies crípticas, pois disponibilizam informações não somente para a separação das espécies, como também para estudos de genética de populações e filogenia. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo reconstituir a filogenia do gênero *Liriomyza* utilizando sete populações de *L. sativae* das regiões Nordeste e Sudeste do Brasil através do marcador molecular Citocromo Oxidase I (COX I) e analisar a divergência genética existente entre estas populações. Foi possível observar que o valor de F_{ST} variou entre baixo a moderado grau de divergência genética. Através da rede de haplotipos foi possível detectar a presença de apenas 14 haplótipos onde o haplótipo H1 foi o mais frequente devido a sua presença em 81 indivíduos distribuídos entre as populações analisadas. Através da reconstrução da filogenia do gênero *Liriomyza* foi detectada a presença de um único clado para *L. sativae*, sendo demonstrado através deste resultado que as populações apresentam elevado grau de conservação de informação genética dentro das populações estudadas.

PALAVRAS-CHAVE: Mosca minadora, DNA *barcode*, divergência genética.

GENETIC STRUCTURE OF NATURAL POPULATIONS

Liriomyza sativae BLANCHARD (DIPTERA: AGROMYZIDAE)

ABSTRACT – The flies miner of *Liriomyza sativae* species are pests of vegetables in various worldwide. These flies have rapid life cycles, high population growth rate resulting in significant economic losses, in addition to having a high ability to acquire resistance to insecticides making their control difficult . Molecular analyzes have proven useful for studies to identify cryptic species , as provide information not only for the separation of species , but also for studies of population genetics and phylogenetics . In this context, the present study aimed to reconstruct the phylogeny of the genus *Liriomyza* using seven populations of *L. sativae* in the Northeast and Southeast regions of Brazil through molecular marker Cytochrome oxidase I (COX I) and analyze existing genetic divergence between these populations . It was observed that the value of F_{ST} ranged from low to moderate degree of genetic divergence . Through the network of haplotypes was possible to detect the presence of only 14 haplotypes where the H1 haplotype was the most common due to its presence in 81 individuals distributed among populations. Through the reconstruction of the phylogeny of the genus *Liriomyza* detected the presence of a single clade to *L. sativae* , being demonstrated by this result that populations have a high degree of conservation of genetic information within populations.

KEYWORDS: Fly miner , DNA barcode, divergence genetic

Introdução

O gênero *Liriomyza* apresenta 376 espécies, sendo 23 espécies de importância econômica, sendo cinco destas polívoras *Liriomyza trifolii* (Burgess); *L. bryoniae* (Kaltenbach); *L. huidobrensis* (Blanchard); *L. sativae* (Blanchard); *L. strigrata* (Meigen) (Parrella, 1987). Estas espécies se estabeleceram em áreas agrícolas de todo o mundo causando sérios prejuízos a um amplo número de espécies vegetais economicamente importantes (Spencer, 1973). Acredita-se que a distribuição para novas áreas geográficas aconteceu através da comercialização de hortaliças (Reitz *et al.* 2013).

A mosca minadora adulta mede de 1 a 3 mm de comprimento, possui corpo com coloração predominantemente preta com manchas amareladas no escutelo, na parte superior da cabeça e nas laterais do tórax. As fêmeas ovipositam dentro do tecido foliar e o período de incubação dos ovos é de aproximadamente três dias; após esse período as larvas eclodem e iniciam imediatamente a atividade alimentar, passando por quatro ecdises (Parrella, 1987). O período larval pode durar de 7 a 10 dias nas condições ambientais do Semi-Árido Nordestino (Araujo *et al.* 2013). As minas causadas pela mosca se tornam perceptíveis de três a quatro dias após a oviposição e tornam-se maiores com o desenvolvimento da larva que ao se alimentar, diminui o nível de fotossíntese da planta, que provoca a queda prematura da folha, o que pode resultar na falta de sombreamento causando dano indireto aos frutos (Carpinera, 2001).

Na maior região produtora de melão (*Cucumis melo* L.) do Brasil, localizada na região do Semi-Árido nordestino (Estados do RN, CE, BA e PE), a mosca minadora era considerada praga secundária. A variação genética encontrada em *L. sativae* poderia explicar a elevada variação observada em estudos anteriores sobre sua biologia (Zhang *et al.* 2000, Tokumar, 2003, Haghani *et al.* 2007). Estudos biológicos com diferentes populações de *L. sativae* têm se mostrado de extrema relevância, dando fortes indícios da existência de um complexo de

espécies crípticas para *L. sativae* (Scheffer, 2005). Desde a década de 70 a molécula do DNA mitocondrial (mtDNA) passou a fazer parte de muitos estudos envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas e o entendimento de aspectos biológicos e evolutivos de uma grande variedade de organismos (Wilson *et al.* 1985) O uso do DNA *barcode* tem apresentado alta taxa de sucesso de identificação rápida de espécies de diversos grupos de artrópodes, aves, peixes e anfíbios (Hebert *et al.* 2004, Ward *et al.* 2005, Kerr *et al.* 2007, Smith *et al.* 2008). O presente trabalho teve como objetivo realizar a identificação molecular de sete populações pertencentes ao gênero *Liriomyza* localizadas nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil através do marcador molecular COX I e analisar a divergência genética existente entre estas populações.

Material e Métodos

Extração de DNA, PCR e Sequenciamento. Para realização deste trabalho foram realizadas extrações de DNA de 106 espécimes de *L. sativae*, obtidos em seis localidades do Brasil, em diferentes hospedeiros: 20 Jaguaruana - CE (melão); 19 Mossoró - RN (melão); 15 Gravatá - PE (tomate); 18 Camocim de São Felix - PE (tomate e feijão); 18 Juazeiro - BA (melão) e 16 Venda Nova do Imigrante - ES (tomate). Para extração do DNA utilizou-se Chelex® 100 (BioRad, Berkeley, California, USA) segundo o método descrito por Wash (1991). Após esse procedimento as amostras foram estocadas a -20°C até o momento da reação de PCR. Foi utilizada uma região do gene mitocondrial Citocromo oxidase I (COX I), associada ao DNA *barcode*, para a amplificação dessa região utilizando os primers HCO2198-L (5'-TAAACTTCWGGRTGWCCAAARAATCA-3') e LCO1490-L (5'-GGTCWACWAATCATAAAGATATTGG-3') (Hebert *et al.* 2003).

As reações de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas utilizando o Kit Mix Go Taq Colorless seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (Promega®)

Fitchburg, Wisconsin, USA). Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% através da luz UV e purificados usando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega® Fitchburg, Wisconsin, USA). O sequenciamento foi realizado através do sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems, Cleveland, Ohio, USA). As sequências foram avaliadas quanto ao grau de confiabilidade de cada um dos nucleotídeos utilizando valores de PHRED 30, seguido da montagem dos consensos através do Software CodonCode Align. Alinhamentos locais foram realizados utilizando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul, 1990) para confirmação da especificidade dos produtos sequenciados.

Análises filogenéticas. As sequências nucleotídicas correspondentes ao gene Citocromo Oxidase I de *L. sativae* foram alinhadas e editadas usando o MEGA 6.0 (Tamura, 2011). Um alinhamento múltiplo foi realizado utilizando o programa Muscle (Edgar, 2004). As análises das relações filogenéticas entre os haplótipos foram feitas através do método probabilístico de Máxima Verossimilhança utilizando o software PhyML (Guindon, 2010). O modelo evolutivo HKY foi o mais adequado ao conjunto de dados de acordo com o software jModelTest (Posada, 2008). Para a construção da árvore filogenética foi utilizado o teste estatístico de suporte bootstrap com valor de 1000 pseudoreplicas aleatórias. Neste estudo sequências já descritas de *L. trifolii* e *L. sativae* foram adicionadas para compor o conjunto de dados a fim de auxiliar na taxonomia molecular dos espécimes estudados. Foram utilizadas também sequências das espécies *L. huidobrensis*, *L. bryoniae*, *Phytomyza ranunculivora* e *P. rufipes* por serem grupos-irmãos de *L. sativae*.

Diversidade genética e estruturação populacional. A diversidade genética intra-populacional foi mensurada através da análise de diversidade haplotípica e nucleotídica, valor K (número de grupos genéticos), número de sítios polimórficos e número de transições e transversões, utilizando-se os softwares DnaSP 4.0 (Rozas *et al.* 2003) e o Arlequin 3.5

(Excoffier & Lischer, 2010). O teste de neutralidade D de Tajima baseia-se na distribuição das frequências de mutação e na distribuição de haplótipos, distinguindo as diferenças entre as sequências de DNA evoluindo aleatoriamente ("neutra") e daquelas que evoluem no âmbito de um processo não aleatório. Por sua vez a estatística de F_s de F_u foi utilizada para examinar a estabilidade populacional avaliando a ocorrência de expansão populacional ou hitchhiking genético. Foram feitas análises quanto ao nível de diferenciação genética com base no índice de fixação F_{st} de forma pareada entre as populações usando o software Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). O número médio de substituições por sítios entre as populações (D_{xy}), o número total de substituições por sítios entre as populações (D_a), número de polimorfismos compartilhados entre as populações pareadas (S_s) e o número de diferenças fixadas entre as populações pareadas (S_f) foram calculados no software DnaSP 4.0 (Rozas *et al.* 2003). A rede de haplótipos foi gerada através do software NETWORK 4.6 (www.fluxus-engineering.com) utilizando o método Median-joining (Bandelt *et al.* 1999) para verificar o nível de compartilhamento e a frequência de distribuição dos haplótipos entre as populações.

Resultados

A partir das 106 amostras amplificadas e sequenciadas foram obtidos fragmentos com aproximadamente 700 pares de bases referentes ao DNA *barcode*. Cada uma das sequências geradas foram submetidas às análises comparativas utilizando o banco de dados moleculares não redundante encontrado no NCBI. Nas avaliações intrapopulacionais foram observados 15 sítios variáveis, distribuídos entre oito sítios informativos de parcimônia e sete *singletons*, representando respectivamente 1,1% e 0,9% do total de sítios observados.

Foram realizadas também análises de diversidade intrapopulacional, que evidenciaram baixos níveis de diversidades nucleotídica e haplotípica, podendo estes resultados estar relacionados com interferências abióticas e bióticas no padrão evolutivo destas populações

estudadas. A diversidade nucleotídica (π) variou entre 0 e 0,00177, enquanto que a diversidade haplotípica (HD) variou de 0 e 0,64286 (Tabela 2). Através da rede de haplótipos foi possível detectar a presença de 14 haplótipos (Fig. 1), onde o haplótipo H1 foi o mais frequente devido a sua presença em 81 indivíduos distribuídos entre os 106 espécimes das sete populações investigadas. Levando em consideração o tipo de hospedeiro, duas populações apresentaram haplótipos exclusivos H2, H6 (na população CAF) e H3 e H5 (na população CAT).

Com relação ao número médio de diferenças pareadas o valor mais significativo de divergência interpopulacional foi encontrado nas populações de *L. sativae* de CAF e CAT, quando comparadas entre si. O mais elevado grau de diferença intrapopulacional foi obtido na população de *L. sativae* CAT, e em relação à Distância de Nei o maior nível de diferenciação genética foi observado entre as populações de JUAZ e RN.

Através das análises interpopulacionais foi possível observar um valor de baixo a moderado de divergência genética, estimado a partir do parâmetro F_{ST} (0,00-0,09). O maior valor de F_{ST} (0,09) foi encontrado entre as populações de *L. sativae* CAT e VNI, sendo este valor de, refletindo assim num baixo grau de divergência genética entre essas populações. Foram observados também valores baixos de substituições por sítios quando realizado comparações entre populações, devido principalmente ao grande número de sítios conservados entre os indivíduos que compõem estas populações, contribuindo assim para falta de estruturação genética entre as populações estudadas. Outro parâmetro avaliado que auxilia na explicação da falta de estruturação genética das populações é o número baixo de sítios compartilhados, sendo os maiores valores encontrados nas populações de Camocim de São Félix (tomate), Camocim de São Félix (feijão) e Gravatá (tabela 3)

Os resultados obtidos através do método de reconstrução filogenética de máxima verossimilhança (Figura 1) para as amostras de *L. sativae* avaliadas neste trabalho apontaram para a existência de dois clados distintos. Um dos clados foi composto por espécimes de *L.*

sativae do banco de dados e um outro formado unicamente por amostras pertencentes as populações brasileiras avaliadas neste trabalho. A presença destes dois clados para a espécie *L. sativae* apresentou um valor de suporte de 67%. Foi realizada também a reconstituição da filogenia para as espécies *L. sativae* e *L. trifolii*, as quais se apresentaram como clados bem delimitados com um valor de suporte de 99%. Estes resultados das análises filogenéticas confirmam que as populações brasileiras avaliadas neste estudo pertencem apenas a espécie *L. sativae*.

Discussão

Um dos principais meios de avaliar a utilidade dos caracteres morfológicos é a investigação de sua relevância na filogenia de grupos fortemente sustentados pela taxonomia clássica, como ocorre nos agromizídeos. Na família Agromyzidae, as características morfológicas estão fundamentadas principalmente nos esquemas de linhas filéticas proposto por Spencer (Spencer, 1990). Devido a isto, marcadores moleculares têm sido cada vez mais utilizados como ferramenta complementar para identificação taxonômica para muitas espécies, principalmente devido ao fato da taxonomia clássica não ter conseguido auxiliar na identificação de algumas espécies crípticas (Hebert *et al.* 2003, 2004). Diversos trabalhos têm sido realizados utilizando a taxonomia molecular em varias espécies de insetos de importância econômica, inclusive do gênero *Liriomyza* (Scheffer & Lewis 2001, Scheffer *et al.* 2006, Liping *et al.* 2008).

Os resultados da taxonomia molecular indicaram a presença de dois clados monofiléticos para as espécies *L. sativae* e *L. trifolii* ao ser utilizado o marcador molecular DNA *barcode* nas populações brasileiras estudadas. Resultados similares foram obtidos por Scheffer *et al.* 2006, ao analisarem populações de *L. sativae* e *L. trifolii* distribuídas nas Filipinas através do DNA *barcode*, obtendo-se clados distintos para as duas espécies

pertencentes a este gênero, demonstrando assim a eficiência deste marcador molecular na caracterização das espécies que compõem esta família de insetos de importância econômica. Entretanto no Brasil poucos estudos relacionados à genética de populações vem sendo realizados para este complexo de espécies, sendo necessária a ampliação das populações estudadas. Um dos primeiros estudos de taxonomia molecular para estas espécies no Brasil foi realizado por Lima *et al.* (2009), onde foram analisados espécimes do gênero *Liriomyza* do município de Mossoró, Rio Grande do Norte, sendo estes identificados como *L. sativae*, sendo este resultado confirmando em nosso estudo.

A recuperação da filogenia do gênero também é sustentada pelos diferentes caracteres morfológicos capazes de separar estas duas espécies. Contudo, a enorme dificuldade na identificação morfológica destas espécies devido principalmente as diferenças sutis e a ausência de especialistas para caracterizá-las estão entre os principais fatores para toda problemática entre *L. sativae* e *L. trifolii*. Entre as principais características morfológicas que diferem *L. sativae* e *L. trifolii* são genitália masculina e coloração das órbitas e do mesonoto (Spencer 1973, 1976).

A análise de divergência genética não obteve valor significativo entre as populações brasileiras de *L. sativae* ao ser utilizado o índice de fixação genética (Fst) para avaliar a diferenciação genética destas populações. Entretanto os resultados obtidos nas populações de *L. sativae* de Camucim de São Félix-PE (tomate e feijão) apresentaram uma divergência genética considerável entre estas populações quando comparadas com as outras, implicando numa provável relação hospedeiro-praga, como descrito em outros trabalhos (Pang *et al.* 2005, Li Ping *et al.* 2008).

As populações introduzidas mostram variação genética reduzida por causa de gargalos que eles tendem a passar durante o período de introdução no novo ambiente (Nei *et al.* 2005). Trabalhos recentes com insetos praga (Puillandre *et al.* 2008, Ahern *et al.* 2009) demonstram

que a redução da diversidade genética é comum em espécies invasoras, mas não é um fator limitante para o sucesso destas espécies. Outro fator importante para explicar a baixa variabilidade genética observada neste trabalho seria o uso de agrotóxicos que exercem forte pressão de seleção e a adoção periódica desse método de controle pode estar levando à eliminação não-seletiva de haplótipos, podendo favorecer os haplótipos raros oriundos de mutações não-sinônimas, principalmente se as mesmas forem associadas a genes ligados à resistência de insetos aos inseticidas em uso (Bass & Field, 2011).

A partir de 1970 os ataques de *Liriomyza* spp. se tornaram bastante frequentes e se intensificaram em várias culturas agrícolas de todo mundo, inclusive no Brasil, neste momento o comércio internacional de produtos hortícolas (por exemplo, frutas, legumes e ornamentais) começaram a crescer, sendo assim um fator importante de dispersão para esta espécie (Chavez & Raman, 1987; Leibeck & Capinera, 1995; Huang, 2004). Este evento pode explicar a baixa diversidade haplotípica em espécies que foram introduzidas recentemente em um determinado ambiente como no caso de *L. sativae*, que teve seu primeiro registro no Brasil na década 60 (Nakano, 1967). Em estudos relacionados com insetos praga tem-se observado uma redução significativa na variação genética destas espécies em novo *habitat* sendo atribuída essa alteração dos padrões evolutivos ao efeito fundador, o qual pode influenciar a sobrevivência, além de causar alterações nos traços fenotípicos e no potencial adaptativo (Baliraine *et al.* 2004, Puillandre *et al.* 2008, Ahern *et al.* 2009, Tooman *et al.* 2011). O status taxonômico de uma espécie de importância econômica é essencial para que seu correto manejo seja realizado, nosso estudo mostrou a relevância do uso do DNA *barcode* como uma ferramenta bastante eficiente na identificação molecular das populações da espécie críptica *Liriomyza sativae*, ampliando o conhecimento biogeográfico desta espécie.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado de ECBF.

Literatura Citada

- Ahern, R.G; D.J. Hawthorne & M.J. Raupp. 2009.** Founder effects and phenotypic variation in *Adelges cooleyi*, an insect pest introduced to the eastern United States. *Biol. Invasions*, 11, 951–971.
- Altschul, S.F; W.Gish, W. Miller, E.W. Myers & D.J. Lipman. 1990.** "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Baliraine, F.N; M. Bonizzoni & C.R. Guglielmino. 2004.** Population genetics of the potentially invasive African fruit fly species, *Ceratitis rosa* and *Ceratitis fasciventris* (Diptera: Tephritidae). *Mol. Ecol.* 13:683–695.
- Bandelt, H.J & F.P. Rohl. 1999.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* 16:37-48.
- Bass, C. & L.M. Field. 2011.** Gene amplification and insecticide resistance. *Pest Manag. Science.* 67: 886-890.
- Capinera, J.L. 2001.** Vegetable Leafminer, *Liriomyza sativae* Blanchard (Insecta: Diptera: Agromyzidae). University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, EDIS. Disponível em <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN50700.pdf>. Acesso em: 18 Jan. 2014.
- Chavez, G.L. & K.V. Raman. 1987.** Evaluation of trapping and trap types to reduce damage to potatoes by the leafminer, *Liriomyza huidobrensis* (Diptera, Agromyzidae). *Insect Sci. Appl.* 8: 369-372.
- Excoffier, L. & H.E.L. Lischer 2010.** Arlequin suite version 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 10: 564-567.
- Fernandes, O.A. 2004.** Melão: campo minado. Pelotas, Cultivar, 2 p. (Comunicado Técnico 23).
- Guimarães, J.A., F.R. Azevedo, R.B. Sobrinho, A.L.M. Mesquita. 2005.** Recomendações Técnicas Sobre a Mosca Minadora. Fortaleza, Embrapa Agroindústria Tropical, 6 p. (Comunicado Técnico 107).
- Haghani, M., Y. Fathipour, A.A. Talebi & V. Baniameri. 2007.** Thermal Requirement and development of *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) on cucumber. *J Econ Entomol.* 100: 350-356.

- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball & J.R. Dewaard. 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc Lond.* 270: 313-321.
- Hebert, P.D.N., S. Ratnasingham & J.R. Waard. 2003.** Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270 (Suppl.): S96–S99.
- Hebert, P.D.N., M.Y. Stoeckle, T.S. Zemplak & C.M. Francis. 2004.** Identification of birds through DNA barcodes. *Plos Biol.* 2: 1657–1663.
- Huang, S.W. 2004.** *Global Trade Patterns in Fruits and Vegetables: by USDA Economic Research Service, Washington, DC, p. 83.*
- Kerr, K.C., M.Y. Stoeckle, C.J. Dove, L.A. Weigt, C.M. Francis & P. D. Hebert. 2007.** Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Mol Ecol Notes.* 7: 535-543.
- Kox, L.F.F., H.E. Beld, B.I. Lindhout, L.J.W. Goffau. 2005.** Identification of economically important *Liriomyza* species by PCR-RFLP analysis. *OEPP/EPPO Bulletin*, 35, 79–85.
- Leibee, G.L. & Capinera J.L. 1995.** Pesticide resistance in Florida insects limits management options. *Fla Entomol.* 78: 386-399.
- Li-ping, W., D. Yu-zhou, H. Ya-ting, Z. Fu-shan & L. Zi-qiang. 2008.** Genetic variation of host populations of *Liriomyza sativae* Blanchard. *Agr Sci China* 7: 585-590.
- Nakano, O., F.M. Wiendl, K. Minami. 1967.** Uma nova praga (Agromyzidae) da couve. *Rev. Agrícola.* 42: 1-10 p.
- Nei, M. 2005.** Bottlenecks, genetic polymorphism and speciation. *Rev Genetics.* 170: 1-4.
- Parrella, M. P. 1987.** Biology of *Liriomyza*. *Annu. Rev. Entomol.* 32: 201-204
- Pang, B.P., J.A. Cheng, E.Y. Huang & Z.S. Bao. 2005.** Effects of different host plants on population parameters of *Liriomyza sativae*. *Plant Protection.* 31: 26-28.
- Puillandre, N., S.O. Dupas, J.L. Dangles, C. Zeddani, K. Capdevielle-Dulac, M. Barbin, T. Leguizamon & J.F. Silvain. 2008.** Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. *Biol. Invasions* 10: 319-333.
- Posada, D. 2008.** Jmodeltest: Phylogenetic Model Averaging Molecular. *Biol. and Evolution.* 25: 1253-1256
- Reitz, S. R., Y. Gao & Z. Lei. 2013.** Insecticide Use and the Ecology of Invasive *Liriomyza* Leafminer Management. Disponível em <<http://www.intechopen.com/download/get/type/pdfs/id/42154>> Acesso em: 18 Jan. 2014.

- Scheffer, S.J. & M.L. Lewis. 2001.** Two nuclear genes confirm mitochondrial evidence of cryptic species within *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94:648–653.
- Scheffer, S.J. & M.L. Lewis. 2005.** Mitochondrial phylogeography of vegetable pest *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae): divergent clades and invasive populations. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98: 181-186.
- Scheffer, S.J., L.L. Matthew & C. J. Ravindra. 2006.** DNA barcoding applied to invasive leafminers (Diptera: Agromyzidae) in the Philippines. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 99, 204–210.
- Smith, M.A., J.J. Rodriguez, J.B. Whitfield, A.R Deans, D.H. Janzen, W. Hallwachs & P. D. Hebert. 2008.** Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology, and collections. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 34: 12359-12364.
- Tajima, F. 1989.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics.* 123:585-595.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar. 2011.** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- Tooman, L.K., C.J. Rose, C. Carraher, D.M. Suckling, S.R. Paquette, L.A. Ledezma & R.D. Newcomb. 2011.** Patterns of mitochondrial haplotype diversity in the invasive pest *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entom.* 104: 920-932.
- Tokumaru, S. 2003.** Effects of temperature and photoperiod on development and reproductive potential of *Liriomyza sativae*, *L. trifolii*, and *L. bryoniae* (Diptera: Agromyzidae). *J. Appl. Entomol. Zool.* 47: 143-52.
- Walsh, P.S., D.A. Metzger & R. Higuchi. 1991.** Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR- based typing from forensic material. *BioTechniques.* 10:506-513.
- Ward, R.D., T.S. Zemplak, P.R. I. Last & Hebert, P. D. 2005.** DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 360:1847-1857.
- Wilson, A. C., R. L. Cann, M. George, U.B. Gyllensten, K.M. Helmbjochowski, R. G. Higushi E.M. Palumbi, R.D. Sage & M. Stoneking. 1985.** Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linnean Soc.* 26: 375-400.
- Zhang, R.J., D.J. Yu & C.Q.Zhou. 2000.** Effect of temperature on certain population parameters of *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae). *Entomol Sin.* 7: 185-192.

Tabela 1. Valor do Fst entre as 7 populações de *Liriomyza sativae* estudadas.

	VNI	CAF	CAT	CE	GRAV	RN	JUAZ
VNI	0,00000						
CAF	0,04950	0,00000					

CAT	0,09312	0,00000	0,00000				
CE	0,01597	0,02352	0,03786	0,00000			
GRAV	0,00444	0,00000	0,00000	0,01523	0,00000		
RN	0,06016	0,04438	0,05909	0,03544	0,01578	0,00000	
JUAZ	0,04950	0,04101	0,06129	0,00114	0,00000	0,06704	0,00000

VNI (Venda Nova do Imigrante-ES)

CAF (Camocim de São Felix PE - Feijão)

CAT (Camocim de São Felix PE - Tomate)

CE (Jaguaruana- CE)

GRAV (Gravatá-PE)

RN (Mossoró- Rio Grande do Norte)

JUAZ (Vale do Salitre- Juazeiro)

Tabela 2. Medidas de diversidade genética para cada população de *Liriomyza sativae*.

Populações	N	S	H	Hd	K	π	Tajima's D	Fu's <i>F_s</i>
VNI	16	0	1	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000

CAF	10	5	4	0,53333	1,00000	0,00141	-1,74110**	-0,87633
CAT	8	5	4	0,64286	1,25000	0,00177	-1,59524**	-0,78544
CE	20	5	6	0,51579	0,67895	0,00096	-1,58577**	-3,51960*
GRAV	15	5	4	0,37143	0,66667	0,00094	-1,91084**	-1,22295
RN	19	3	4	0,52047	0,58480	0,00083	-0,86660	- 1,26440
JUAZ	18	2	3	0,39216	0,41830	0,00059	-0,68482	-0,61742

S, Número de sítios segregantes;

H, haplótipos;

Hd, Diversidade haplotípica;

K, Número médio das diferenças;

$\pi \pm SD$, Diversidade nucleotídica.

** $p < 0,05$

* $p < 0,001$

Tabela 3. Diferenciação genética entre populações de *Liriomyza sativae*

Populações	Da	Dxy	Kxy	Ss	Sf
VNI X CAF	0,00000	0,00071	0,50000	0	0
VNI X CAT	0,00000	0,00088	0,62500	0	0

VNI X CE	0,00001	0,00050	0,35000	0	0
VNI X GRAV	0,00000	0,00047	0,33333	0	0
VNI X RN	0,00003	0,00045	0,31579	0	0
VNI X JUAZ	0,00002	0,00031	0,22222	0	0
CAF X CAT	0,00011	0,00149	1,05000	3	0
CAF X CE	0,00001	0,00120	0,85000	0	0
CAF X GRAV	0,00006	0,00112	0,79333	3	0
CAF X RN	0,00003	0,00115	0,81579	0	0
CAF X JUAZ	0,00002	0,00102	0,72222	0	0
CAT X CE	0,00001	0,00138	0,97500	0	0
CAT X GRAV	0,00007	0,00128	0,90833	3	0
CAT X RN	0,00003	0,00133	0,94079	0	0
CAT X JUAZ	0,00002	0,00120	0,84722	0	0
CE X GRAV	0,00001	0,00097	0,68333	0	0
CE X RN	0,00003	0,00093	0,65526	1	0
CE X JUAZ	0,00000	0,00078	0,55000	1	0
GRAV X RN	0,00001	0,00090	0,63509	1	0
GRAV X JUAZ	0,00000	0,00076	0,54074	1	0
RN X JUAZ	0,00005	0,00076	0,53801	1	0

Da, Número líquido de substituições por sítios entre as populações;

Dxy, Número médios de substituições nucleotídicas por sítios entre os dois grupos; Kxy,

Diferença média de nucleotídeos par a par entre dois grupos;

Ss, Sítios compartilhados;

Sf, Sítios fixados.

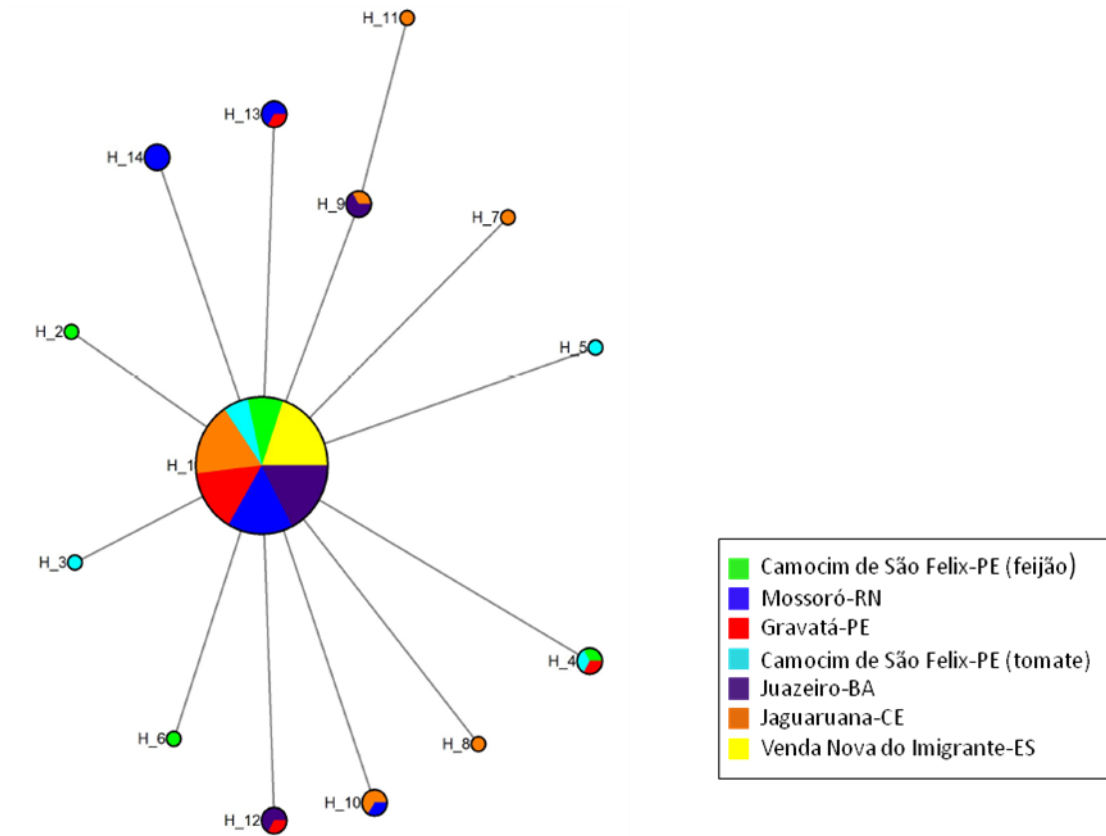


Figura 1. Frequência de Haplotipos encontrados nas 7 populações de *Liriomyza sativae*.

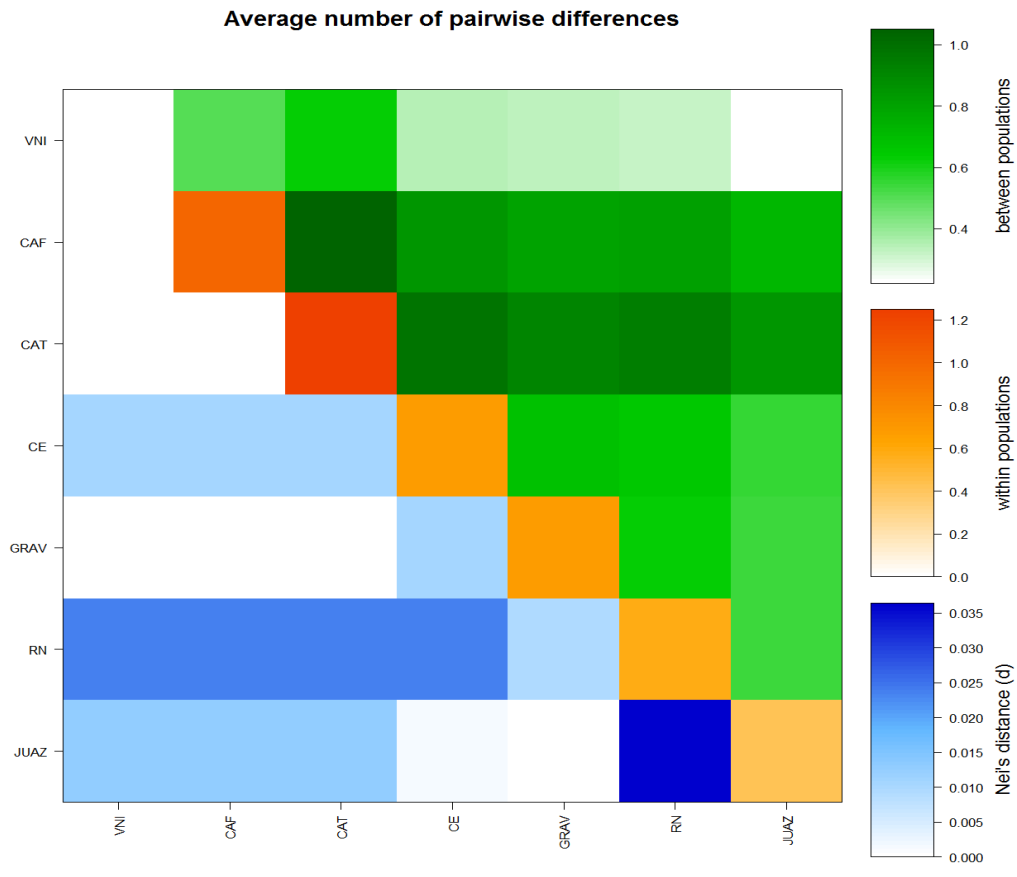


Figura 2. Número médio das diferenças pareadas intra e interpopulacionais

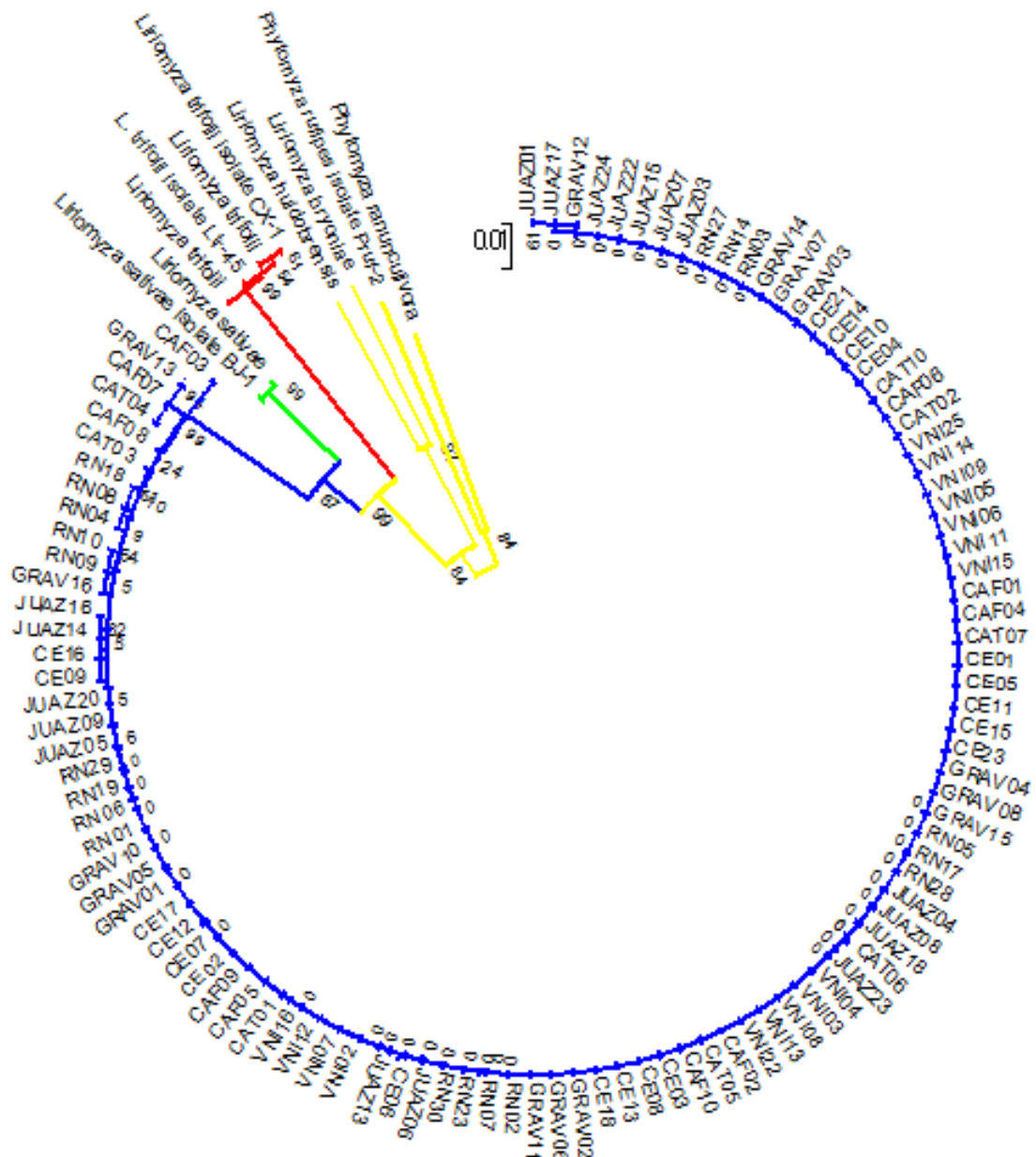


Figura 3. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança mostrando a presença de apenas um clado para *Liriomyza sativae*.