



LELIANE SILVA COMMAR

ZAPRIONUS INDIANUS: UMA VISÃO DA ESPÉCIE
INVASORA SOB O ASPECTO GENÉTICO E EVOLUTIVO

**Tese apresentada para
obtenção do Título de Doutor
em Genética.**

Leliane Silva Commar

ZAPRIONUS INDIANUS: UMA VISÃO DA ESPÉCIE INVASORA
SOB O ASPECTO GENÉTICO E EVOLUTIVO

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron
Co-orientadora: Profa. Dra. Claudia Marcia Aparecida Carareto

São José do Rio Preto
2011

Silva Commar, Leliane.

Zaprionus indianus: uma invasão da espécie invasora sob o aspecto genético e evolutivo/ Leliane Silva Commar. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.

115 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Carlos Roberto Ceron

Co-orientador: Cláudia Márcia Aparecida Carareto

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética molecular. 2. Evolução molecular. 3. Drosófila. 4. Zaprionus indianus. I. Ceron, Carlos Roberto. II. Carareto, Cláudia Márcia Aparecida. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 575.852

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

Leliane Silva Commar

ZAPRIONUS INDIANUS: UMA VISÃO DA ESPÉCIE INVASORA
SOB O ASPECTO GENÉTICO E EVOLUTIVO

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron
UNESP – São José do Rio Preto - SP
Orientador

Prof. Dr. Victor Hugo Valiati
Universidade do Vale do Rio dos Sinos – Unisinos - RS

Prof^a. Dr^a. Hermione E M de CAMPOS BICUDO
UNESP – São José do Rio Preto - SP

Prof^a. Dr^a. Maria Tercília V de Oliveira
UNESP – São José do Rio Preto - SP

Prof. Dr. Hamilton Cabral
Universidade de São Paulo – USP - Ribeirão Preto - SP

São José do Rio Preto
04/março/2011

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Bioquímica, do Departamento de Química e Ciências Ambientais, no Laboratório de Populações de Insetos e no Laboratório de Evolução Molecular de Insetos, do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), sob orientação do Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron e co-orientação da Profa. Dra. Claudia Marcia Aparecida Carareto, com bolsa de Doutorado no País do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Aos meus Pais

Leila e José Maria

Agradeço a Deus imensamente por essas duas pessoas estarem sempre presentes em minha vida. Vocês são para mim exemplo de dignidade respeito, sabedoria, lealdade, bondade, generosidade.....

Todas as palavras seriam insuficientes para demonstrar toda a minha gratidão. Sempre me ofereceram o melhor. O carinho, a compreensão e a educação que me proporcionaram foram muito importantes para a minha formação. Todas as minhas conquistas só foram possíveis à dedicação e o sacrifício que vocês fizeram por mim.
Obrigada!

“A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade”

Carlos Drummond de Andrade

Agradecimentos

Ao término desta etapa do trabalho, expresso agora, com palavras, a minha gratidão, ao permanente apoio e incentivo das pessoas que contribuíram na sua realização.

A Deus pela minha vida e pelas minhas realizações.

Aos meus pais, Leila e José Maria, por sempre acreditarem em meus sonhos e me apoiarem em todas as decisões, sempre com muito respeito, carinho e amor. Obrigada por tudo, amo vocês! A dignidade e a educação são a fortuna que vocês me deixaram como herança.

À minhas avó Ivone pelas palavras de apoio, por todo amor e carinho que sempre demonstrou, ao meu avô Antônio (*in memorium*) e minha avó Zulmira (*in memorium*) que apesar de não ter estado fisicamente presente, com certeza torceu muito por mim e deve estar feliz por mais esta conquista. Sinto muito a falta de vocês!

Aos meus preciosos e amados irmãos, Juliana e Rodrigo, que sempre estiveram ao meu lado, pessoas muito especiais em minha vida!

Meu marido, Gustavo, por me acompanhar sempre de perto em tudo que faço, pelas sugestões e conselho sempre valiosos, pelo incentivo e por todo amor que recebo. Obrigada por tudo!

Aos meus familiares que sempre me incentivaram e, muito mais que isso sempre acreditaram em minhas conquistas... Agradeço pela compreensão da minha ausência em alguns momentos....

Às pessoas queridas que moram em meu coração: Maria de Fátima, Marcus Vinícius, Angélica, Juliana e Lucas. Obrigada pelo constante apoio e palavras de incentivo para que eu pudesse vencer mais essa etapa.

Às grandes amigas que conquistei nestes anos, Rejane Yuriko Ouchi, Adriana Granzotto, Elaine Dias, Débora Okamoto, Lilian Medeiros, Mariana Gomes, Leiza Penariol, Ana Letícia Guerra e Paula Curi pelo carinho e por todos os momentos maravilhosos que passamos juntos. Em especial deixo minha imensa gratidão a Elaine e a Adriana pelos momentos que passamos no laboratório, risadas, fofocas e angústias,

agradeço também pelo conhecimento que me proporcionaram, que foi de grande valia para a realização deste trabalho. Agradeço imensamente a amizade sincera e a paciência que tiveram comigo.

Ao Luís Gustavo da Conceição Galego um grande amigo e colaborador deste trabalho. Uma pessoa maravilhosa, companheira com um alto astral incrível. Obrigada!

À Eliani Nobuco Ikeguchi Ohira e Rita Beatriz de Seixas pela grande amizade cultivada todos estes anos e que jamais perecerá.

Aos amigos e colegas que compõem o grupo do Laboratório Genética e Evolução de Insetos do Departamento de Biologia: Elias, Fabrício, Marcela e Ana Luiza pelos momentos agradáveis que passamos juntos.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron pelo exemplo de profissionalismo, que muito tem contribuído para minha formação científica. Por sua cumplicidade nas conquistas e nas dificuldades. Além de orientador, tornou-se ao longo dos anos de convivência, um grande conselheiro e amigo. Sou imensamente grata!

À Profa. Claudia Marcia Aparecida Carareto, minha co-orientadora, pela amizade, incentivo, paciência e orientação. Um exemplo de dedicação ao ensino e a pesquisa.

À Direção do IBILCE pelas condições materiais que proporcionaram a realização deste trabalho.

Aos Professores de Programa de Pós-Graduação em Genética, que ajudaram para que esse trabalho tivesse êxito, minha admiração e respeito por todos.

Ao técnico Sebastião Dias Barbosa, responsável pelos meios de cultura, pela sua dedicação e disposição em ajudar a qualquer momento.

Ao Conselho Nacional e Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudos ao nível de doutorado.

“A amizade duplica as alegrias e divide as tristezas.”

Francis Bacon

RESUMO

Zaprionus indianus é uma espécie de mosca de origem africana que se dispersou pelas regiões tropicais da Ásia e das Américas. Grande interesse tem sido despertado sobre essa espécie, principalmente pela recente expansão da sua área de distribuição com a invasão do continente americano, ocorrida na década de 90. Hoje, indivíduos dessa espécie são encontrados em uma larga amplitude latitudinal, do Uruguai a Belém (Brasil), além do Panamá (América Central) e Flórida (Estados Unidos). Tem sido proposta que a introdução de *Z. indianus* no Brasil ocorreu no Estado de São Paulo e de lá a espécie se propagou para outros estados brasileiros por meio do comércio de frutas. Entretanto, a rota de dispersão dessa espécie não foi ainda completamente estabelecida. Na tentativa de esclarecer essa questão, avaliamos a variabilidade genética de dois marcadores, um fragmento do gene COI (citocromo oxidase I), de 612 pb, e do gene ortólogo ao *Est-6* de *Drosophila melanogaster*, de 747 pb, em 19 populações de *Z. indianus*, de diversas regiões geográficas, englobando África, Ásia e Américas. A análise do polimorfismo do gene ortólogo ao *Est-6* mostrou uma elevada diversidade nucleotídica, resultado de substituições sinônimas, indicando seleção purificadora atuando neste gene, tanto nas populações ancestrais como nas invasoras. Para o propósito de estabelecer a rota de dispersão de *Z. indianus*, foi construída uma rede de haplótipos por meio do método “median-joning network” para os dois marcadores. Os resultados são inéditos, pois indicam a ocorrência de duas invasões no Brasil, ao contrário de estudos anteriores que sugeriram apenas uma. Esses resultados também sugerem que a invasão de *Z. indianus* na América do Norte se deu a partir de migrantes de populações brasileiras, e não africanas ou asiáticas. Essa invasão pode estar diretamente relacionada ao fato de o Brasil ser hoje o terceiro maior produtor mundial de frutas e exportador de mais de 14 culturas para os Estados Unidos. Interessantemente, a Flórida é um dos principais centros de atividades comerciais e financeiras na América do Norte, apresenta clima subtropical, o que explicaria a introdução de *Z. indianus* a partir de populações brasileiras, e seu estabelecimento, primeiramente neste estado norte-americano.

Palavras-chave: *Zaprionus indianus*; bioinvasões; polimorfismo; marcadores moleculares

ABSTRACT

Zaprionus indianus is a species of an African origin which has dispersed through tropical Asian as well as South and North America regions. Great interest has been taken at this species, mainly for the fact that recently its distribution has been expanded to American continent due to the invasion probably occurred in the nineties. Nowadays individuals from this species are found in wide latitudinal extent, from Uruguay to Belem (Brazil), besides Panama (Central America) and Florida (The United States). It has been proposed that *Z. indianus* introduction in Brazil happened from the São Paulo to other Brazilian states through fruit trading, though this species' dispersion route has not been completely established. In order to clarify this issue we evaluated genetic variability of two markers, a sequence of the gene *COI* (cytochrome oxidase I), 612 bp long and of the ortholog to *Est-6* gene from *Drosophila melanogaster*, 747 bp long, in 19 populations of *Z. indianus* from several geographic regions, covering Africa, Asia and America. Polymorphism analysis of ortholog to *Est-6* gene showed an elevated nucleotide diversity, resulting from synonym substitutions, indicating a purifying selection acting on this gene, which occurred in ancestral populations, as well as in the invader ones. Aiming at establishing the *Z. indianus* dispersion route, a haplotype network was built, using median-joining network method for the two markers. The results are unreleased, for they indicate the occurrence of two invasions in Brazil, in opposition to previous studies that have indicated just one. They also demonstrate that *Z. indianus*' invasion in North America has happened from Brazilian population migrants, not African or Asian ones. This invasion can be directly related to the fact that Brazil is currently the third largest world fruit producer and exports over 14 cultures to the USA. Interestingly, Florida is one of the main financial and commercial activity centers in North America, and it has subtropical weather, which would explain the *Z. indianus*' introduction from Brazilian populations and its establishment first in this North American state.

Key Words: *Zaprionus indianus*; bioinvasions; polymorphism; molecular markers.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVOS.....	17
3.	CAPÍTULO I - Análise do polimorfismo interpopulacional do gene ortólogo ao da esterase-6 de <i>Drosophila melanogaster</i> em <i>Zaprionus indianus</i>	19
4.	CAPÍTULO II - The intercontinental dispersion scenario of drosophilid <i>Zaprionus indianus</i> revealed by mitochondrial and nuclear markers.....	48
5.	CAPÍTULO III - Análise taxonômica e evolutiva de <i>Zaprionus indianus</i> e o sucesso de sua invasão nos diferentes continentes.....	69
6.	DISCUSSÃO.....	104
7.	CONCLUSÕES.....	108
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As bioinvasões caracterizam-se pela introdução intencional ou não de espécies exóticas. Segundo Lincoln et al. (1998), espécies exóticas são organismos não nativos que foram introduzidos dentro de uma área, conceito este ampliado pela UNEP (United Nations Environmental Program, disponível em <http://www.unep-wcmc.org/reception/glossary>, acesso em 15/04/2007) em 2004, que acrescentou a idéia da coexistência destes organismos com espécies nativas.

Independente do processo pelo qual se dá as invasões, várias conseqüências possíveis; dentre elas, a origem de mudanças bióticas e abióticas do ecossistema invadido (LODGE, 1993) e até mesmo a extinção de espécies nativas (FRITTS; RODDA, 1998) e Em escala global, a destruição dos habitats e a introdução de espécies exóticas estão contribuindo para o declínio da diversidade de espécies, como també em escalas regionais e locais. Entretanto, a diversidade pode ser comumente crescente, quando há um aumento da riqueza de espécies locais (SAX; GAINES, 2003). Além disso, espécies introduzidas podem trazer riscos à saúde pública (RUIZ et al., 2000) e prejuízos à agricultura (PIMENTEL et al., 2001).

As espécies da família Drosophilidae têm demonstrado uma ampla variação no padrão de distribuição geográfica e muitas delas já demonstraram seu potencial invasivo como *Drosophila melanogaster* (DAVID; CAPY, 1988), *D. subobscura* (AYALA et al., 1989; HUEY et al., 2000), *D. simulans* (HAMBLIN; VEUILLE, 1999), *D. malerkotliana* (VOGL et al., 2003) e *D. ananassae* (VAL; SENE, 1980). Diversos trabalhos propõem que o processo de dispersão de espécies de Drosophilidae está diretamente relacionado com ações antropofílicas (TIDON et. al, 2003; GALEGO; CARARETO, 2007; YASSIN et al., 2008; GALEGO; CARARETO, 2010). O número de espécies transportadas, mesmo involuntariamente, pela ação humana, por exemplo, rompendo barreiras geográficas é enorme. No entanto, apenas uma fração dessas espécies é capaz de se estabelecer em um novo território, e entre eles, geralmente, 1% tem o potencial de se tornar uma praga (SILVA et al., 2005ab). De acordo com alguns trabalhos, no processo invasivo deve se levar em consideração as características biológicas dos invasores (KOLAR; LODGE, 2001), as características ecológicas das comunidades invadidas (LONSDALE, 1999, TSUTSUI, et al. 2000), a interferência do invasor na

disponibilidade de recursos (SHER; HYATT, 1999, DAVIS et al., 2000) e a presença de inimigos naturais e de ocupação de espaço (KEANE; CRAWLEY, 2002), para o sucesso do estabelecimento da espécie.

Recentemente, uma espécie de drosofilídeo foi introduzida no Brasil e aqui se tornou uma importante praga da cultura do figo (VILELA et al., 2000) e uma eficiente competidora de espécies nativas (SANTOS et al., 2003), a mosca africana *Zaprionus indianus*. Considerando-se as estratégias de colonização dessa espécie, Silva et al. (2005b) sugeriram que, juntamente com a capacidade de viver em ambientes associados ao homem, sua capacidade para recuperar os níveis populacionais elevados, em condições favoráveis, contribuem para a sua competência para a expansão e colonização de novas áreas.

Zaprionus indianus é o drosofilídeo mais comum do subgênero *Zaprionus*. Apesar do nome, esta espécie é supostamente nativa do continente africano (ARARIPE et al. 2004). Foi descrita por Gupta, em 1970, e o primeiro registro de sua ocorrência em território sul-americano data de 20 de março de 1999 (VILELA, 1999). Atualmente, o gênero *Zaprionus* constitui-se de 55 espécies (TSACAS; CHASSAGNARD, 1990; CHASSAGNARD; TSACAS, 1993) e apresenta uma ampla distribuição geográfica, pois ocorre por toda África, em ilhas do Oceano Índico (Ilhas Comores, Madagascar, Seychelles, Reunião e Mascarenhas), do Atlântico (Ilhas Canárias e Santa Helena), Continente Asiático (Índia e Arábia Saudita) e América Latina (Brasil e Uruguai), Central (Equador) e do Norte (Flórida) (TSACAS et al., 1981, VILELA et al., 2001; VAN DER LINDE et al., 2006). O comércio de frutos pode ter contribuído para a rápida expansão de *Z. indianus* no Brasil e países vizinhos (VILELA et al., 2001; STEIN et al., 2003). Apesar de estar restrita às regiões de climas tropical e subtropical quente (KARAN et al., 1999; TIDON et al., 2003), *Z. indianus* mostra características ecológicas generalistas e é capaz de se adaptar a diferentes condições ambientais (PARKASH; YADAV, 1993).

Atualmente existem discussões sobre o posicionamento filogenético do gênero *Zaprionus* dentro da família Drosophilidae. As topologias propostas por Grimaldi (1990) e De Salle (1992) sugerem a inclusão de *Zaprionus* como um gênero da família Drosophilidae. Outras análises filogenéticas (THROCKMORTON, 1975; POWELL; DE

SALLE, 1995; REMSEN; DE SALLE, 1998; KWIATOWSKI; AYALA, 1999) indicam que, apesar das diferenças morfológicas existentes entre as diferentes espécies que compõe a família Drosophilidae e entre *Zaprionus* e espécies do gênero *Drosophila* (THROCKMORTON, 1962, 1975; GRIMALDI, 1990), as espécies do gênero *Zaprionus* apresentam sequências nucleotídicas muito similares àquelas descritas para as espécies da radiação *immigrans-Hirtodrosophila*, do subgênero *Drosophila*, gênero *Drosophila*. Esses resultados justificariam uma nova classificação para o gênero *Zaprionus*, colocando-o como um subgênero dentro do gênero *Drosophila*, ou mesmo, um grupo dentro do subgênero *Drosophila*.

Anatomicamente, *Z. indianus* tem aproximadamente 3,0 mm de comprimento, cor castanha com faixas longitudinais brancas intercaladas com faixas pretas no dorso da cabeça e tórax, além de olhos vermelhos. A mosca-do-figo, como foi denominada no Brasil, alimenta-se principalmente de bactérias e leveduras que participam da fermentação de substratos ricos em carboidratos, especialmente frutos em decomposição. Grande interesse tem sido demonstrado no estudo da espécie *Z. indianus*, principalmente pela sua invasão nas regiões Neotropicais, nos últimos anos, sendo considerada hoje como uma espécie semi-cosmopolita (VILELA, 1999; TIDÓN et al., 2003; SILVA et al., 2005ab), pois a partir de uma origem tropical Africana, colonizou com sucesso o subcontinente indiano, há mais de 4 décadas e, mais recentemente a América do Sul e as Américas Central e do Norte (VILELA, 1999; VAN DER LINDE et al., 2006; YASSIN et al., 2008). Dessa forma, existem muitas especulações com relação ao processo de invasão de *Z. indianus* e sua rota de dispersão. Uma série recente de estudos, com o objetivo de comparar as populações dos três continentes (África, Ásia e América do Sul) foi realizada utilizando diferentes marcadores: o tamanho do genoma (NARDON et al., 2005); inversões cromossômicas (ANANINA et al., 2007); aloenzimas (MATTOS MACHADO et al., 2005; GALEGO et al., 2006) e caracteres quantitativos (DAVID et al., 2006a). Os trabalhos têm apresentado de maneira geral as mesmas conclusões: (i) as populações americanas apresentam um baixo nível de variação genética para os genes analisados (com a exceção de polimorfismo cromossômico e caracteres quantitativos), provavelmente devido à sua introdução muito recente, e (ii) as populações do Velho Mundo (África e Ásia) estão mais próximas entre si do que em relação às populações

americanas (com exceção ao tamanho do genoma) (YASSIN et al., 2008). No entanto, ainda restam dúvidas quanto ao padrão geral de relações entre as populações ancestrais e invasoras, e prováveis rotas de dispersão que têm sido sugeridas.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desta tese foi estabelecer a dinâmica evolutiva e de dispersão de *Zaprionus indianus*. Deste modo, o estudo teve os seguintes objetivos específicos:

- 1) Avaliar o polimorfismo de um fragmento de um gene de *Z. indianus*, ortólogo ao da beta-esterase-6 (*Est-6*) de *D. melanogaster*, visando estabelecer uma relação de ortologia, com base na similaridade nucleotídica e de aminoácido e análise filogenética.
- 2) Realizar análises comparativas entre populações ancestrais e invasoras de *Z. indianus*, por meio do polimorfismo do fragmento do gene ortólogo ao *Est-6* de *D. melanogaster*, e verificar o tipo de seleção atuante nessas sequências.
- 3) Sugerir uma possível rota de dispersão de *Z. indianus* a partir da sua origem para o resto do mundo, utilizando-se os dados de polimorfismo do marcador mitocondrial (COI) e do fragmento do gene nuclear ortólogo ao *Est-6* de *D. melanogaster*.
- 4) Fazer uma revisão das relações filogenéticas, características da história da vida e do processo de dispersão de *Z. indianus* pelos diferentes continentes.

Os resultados deste trabalho estão organizados em capítulos. O capítulo I refere-se aos objetivos 1 e 2, que originaram um manuscrito a ser submetido à publicação. O capítulo II refere-se ao objetivo 3, que resultou em um manuscrito submetido à publicação no periódico internacional *Biological Invasions* e o capítulo III, relaciona-se ao objetivo 4, que resultou em um artigo de revisão a ser submetido à publicação.

Análise do polimorfismo interpopulacional do gene ortólogo ao da esterase-6 de *Drosophila melanogaster* em *Zaprionus indianus*.

Leliane Silva Commar¹; Carlos Roberto Ceron¹ e Cláudia Márcia Aparecida Carareto²

^{1,2} UNESP – Universidade do Estadual Paulista, ¹Departamento de Química e Ciências Ambientais, ² Departamento de Biologia - São José do Rio Preto, SP, Brasil

Resumo

Neste trabalho, foi investigado o polimorfismo nucleotídico de um fragmento gênico putativamente ortólogo ao gene da beta-esterase-6 de *D. melanogaster*, em amostras de linhagens de *Z. indianus*, derivadas da África, da Ásia e das Américas. Essa ortologia foi sugerida com base na similaridade nucleotídica e análise filogenética do fragmento gênico analisado. Foram identificados 12 haplótipos distintos em 19 linhagens analisadas. A alta diversidade nucleotídica, resultado de substituições sinônimas, indicou seleção negativa (purificadora) atuando neste gene, nos dois grupos de populações investigadas, ancestrais e invasoras, sendo os valores de dN/dS das populações africanas e brasileiras mais próximas entre si, reforçando a hipótese de introdução de *Z. indianus* no Brasil a partir da África.

Palavras-chave: beta-esterase 6, dN/dS, polimorfismo, *Zaprionus indianus*

Introdução

Esterase-6 é uma carboxilesterase (E.C. 3.1.1.1) que tem sido estudada e utilizada como um marcador molecular informativo em populações de *Drosophila melanogaster*, em estudos evolutivos (OAKESHOTT et al., 1990, 1993, 1995) e genética do desenvolvimento (OAKESHOTT et al., 1994). Em *D. melanogaster*, o gene *Est-6* codifica a principal das beta carboxilesterases, que é transferida dos machos para as fêmeas através do fluido seminal durante a cópula (RICHMOND et al., 1980), e afeta o seu comportamento reprodutivo, estimulando a oviposição e inibindo a receptividade a outros machos (SHEEHAN et al., 1979; GROMKO et al., 1984; RICHMOND et al., 1991). Em machos, o nível e a quantidade de EST-6 afetam vários componentes do valor adaptativo, como a viabilidade do indivíduo pré-adulto, o tempo de desenvolvimento, o

tempo de cópula e a frequência de recópula, e a fertilidade (GAME; OAKESHOTT, 1990).

A sequência completa da região codificadora do gene da EST-6 em *D. melanogaster* já foi determinada (RICHMOND et al., 1990; OAKESHOTT et al., 1993, 1995). É constituída por 1.686 pares de bases (pb), consistindo de dois éxons com, respectivamente, 1.387 pb (éxon 1) e 248 pb (éxon 2), intercalados por um pequeno íntron de 51 pb (COOKE; OAKESHOTT, 1989; BALAKIREV et al., 2002). Duas aloenzimas [*Fast* (F) e *slow* (S)] de EST-6 foram descritas, as quais respondem diferencialmente a inibidores organofosforados. Essa característica propicia o questionamento sobre a importância biológica e adaptativa do polimorfismo desse gene (WRIGHT, 1961; RICHMOND et al., 1990; OAKESHOTT et al., 1995). Em *D. melanogaster*, foi verificado que apesar da maioria dos sítios do gene da EST-6 estarem sob seleção purificadora, alguns sítios estão evoluindo sob seleção positiva (BALAKIREV et al., 1999, 2002; 2006; BALAKIREV; AYALA, 2003a, 2006). Balakirev et al. (1999) sequenciaram 15 alelos da região codificadora de *Est-6* de populações de *D. melanogaster* da Califórnia e encontraram um pico distinto de aumento de variação na região em torno do sítio responsável pelo polimorfismo aloenzimático (EST6F/S), sugerindo que a manutenção do polimorfismo é resultado de seleção balanceadora. Além do polimorfismo relacionado à variação aloenzimática desse gene, outros polimorfismos foram analisados na sua região codificadora, verificando-se a presença de dois ou mais haplótipos altamente divergentes em populações da África, da Europa, da América do Norte e da América do Sul. O número de haplótipos foi bastante variável entre as populações, por exemplo, na América do Sul (Venezuela), cinco haplótipos distintos foram observados, enquanto que nas populações da Califórnia (América do Norte), 15 haplótipos (BALAKIREV; AYALA 2003a). Balakirev et al. (2005), analisando 8 espécies do subgrupo *melanogaster*, estimou que 6% dos sítios polimórficos do gene *Est-6* evoluem sob pressão de seleção positiva e 49% sob seleção purificadora.

Vários estudos correlacionam a EST-6 de *D. melanogaster* com diferentes beta-esterases em outras espécies de *Drosophila*, sugerindo uma provável homologia entre a EST-6 e estas esterases (YENIKOLOPOV et al., 1989; EAST, 1990; BRADY et al.,

1992). *Drosophila virilis*, por exemplo, possui uma esterase macho-específica, a esterase S, encontrada no epitélio dos bulbos ejaculatórios dos machos, sendo transferida às fêmeas durante a cópula (SERGEEV et al., 1995). A comparação entre as sequências de aminoácidos das duas enzimas mostrou uma identidade de 50%. Já *D. pseudoobscura* produz uma esterase, conhecida como EST-5, que é homóloga a EST-6 de *D. melanogaster*, no entanto, essa enzima desempenha um papel importante na hemolinfa de adultos de ambos os sexos (BRADY et al., 1990).

Estudos iniciais em *Zaprionus indianus* (Drosophilidae), espécie de provável origem africana (TSACAS, 1985), mostraram a existência de pelo menos seis enzimas com atividade esterásica, em géis de poliacrilamida (GALEGO et al., 2006). Esses autores observaram que, assim como observado em *D. melanogaster*, algumas das esterases de *Z. indianus* apresentam uma expressão diferencial considerando a idade e o sexo. Dentre essas enzimas, a EST-2 e EST-5, classificadas como beta-esterases, apresentaram atividade acentuada nos machos e parecem estar relacionadas com a maturidade sexual desses indivíduos, de forma similar ao observado para EST-6 em *D. melanogaster*. Além disso, essas beta-esterases de *Z. indianus* apresentaram os mesmos padrões de inibição para a EST-6 de *D. melanogaster* (GALEGO et al., 2006). Esses estudos sugerem ortologia entre os genes codificadores dessas enzimas.

Visando estabelecer a ortologia entre os genes codificadores das enzimas EST-2 ou EST-5 de *Z. indianus* com o gene codificador da enzima EST-6 de *D. melanogaster*, amplificamos um fragmento gênico de 747 pb, utilizando iniciadores degenerados desenhados a partir da sequência do éxon 1 dos genes ortólogos de 11 espécies de *Drosophila*. As sequências foram obtidas para diversas linhagens de *Z. indianus*, procedentes da África, da Ásia e das Américas, e caracterizadas quanto à similaridade genética com a sequência do gene *Est-6* de *D. melanogaster*, como também foram analisadas quanto à diversidade genética e tipo de seleção atuante entre as 19 linhagens.

O polimorfismo encontrado no fragmento gênico que possivelmente é ortólogo ao *Est-6* em *D. melanogaster*, nas dezenove linhagens de *Z. indianus* originárias de regiões geográficas distintas, demonstrou seleção negativa atuando nesse gene. As análises de diversidade não mostraram diferenças entre as sequências do fragmento gênico ortólogo ao *Est-6* de populações ancestrais e de invasoras, assim como o teste de seleção.

Material e Métodos

Material Biológico

Neste trabalho foram utilizadas 19 linhagens de *Z. indianus* de diferentes localidades (Tabela 1 e Material Suplementar – Figura 1). Essas foram classificadas como ancestrais (África) e invasoras (antigas, as originárias da Ásia, e recentes, as das Américas) de acordo com o local de origem e relatos da literatura.

Tabela 1. Linhagens de *Z. indianus* estudadas, indicando sua localização geográfica e coletores.

	Localidade	Sigla	Localização Geográfica	Coletor
Ancestrais	São Tomé e Príncipe	ST	0°11'08"N/6°36'28"E	David, J ¹
	Abidjan	AB	5°20' 11"N/4°01'36"W	David, J ¹
	Alexandria	ALE	31°13'31"N/29°56'56"E	Stock Center*
Invasoras antigas	Haifa	HA	32°49'56"N/4°58'32"E	David, J ¹
	Delhi	DE	28°36'30"N/77 °13'03"E	David, J ¹
Invasoras recentes	Flórida	FL	26°47'57"N/81°00'12"W	David, J ¹
	Maranhão (São Luís)	MA	3°33'29,4"S /43°31'22,8"W	Valiati, VH ²
	Barros (CE)	CE	7°10'59"S /38°46'59"W	Franco, F.F ³
	Pernambuco (Itamaracá)	PE	8°3'15,4"S/34°52'54,6" W	Rohde, C ⁴
	Brasília	BR	15°46'S/47°55'W	Tidon, R ⁵
	Belo Horizonte	BH	19°55'S/43°56' W	Galego, LGC ⁶
	São José do Rio Preto (SP)	RP	20°49'S/49°22'W	Galego, LGC ⁶
	Rio de Janeiro	RJ	22°54'S 43°12'W	Bitner-M., B ⁷
	Ilhabela (SP)	IB	23°46'S /45°21'W	Fazza, AC ⁶
	Florianópolis (SC)	FPA	27°35'S/48°32'W	Hoffman, P ⁸
	Santa Maria (RS)	SM	29°41'S/53°48'W	Loreto, ELS ⁹
	Porto Alegre (RS)	PA	30°01'S/51°13'W	Valente, V ⁸
	Arambaré (RS)	AR	30°52'34,5''S/51°30'22''W	Krelling, J ²
	Uruguai (Rio Negro)	URUG	32°45'27,9"S/57°5'3,1"W	Goñi, B ²

*: San Diego *Drosophila* Stock Center (50001.1031-00)

¹:Laboratoire Populations, Génétique et Evolution, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), France.

²: Universidade do Vale do Rio dos Sinos - Unisinos RS, Brasil

³: Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil

⁴: Universidade Federal do Pernambuco, UFPE, PE, Brasil

⁵: Universidade de Brasília, DF, Brasil

⁶: Universidade Estadual Paulista, UNESP, SP, Brasil

⁷: Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, RJ, Brasil

⁸: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS, Brasil

⁹: Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

O DNA genômico de 30 indivíduos machos, de cada linhagem, foi isolado de acordo com o protocolo descrito por Daniels e Strausbaugh (1986), com algumas modificações. Foram desenhados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores para amplificar um fragmento do exon 1, equivalente a 747 pb ao gene da β -esterase 6 de *D. melanogaster* (Figura 1), denominados como D1fwd (5'ARB TDC GTG GTC GCG ATA AYG 3') e D1rev (5' TAC GGC GAG TAT ATT CTC CGG 3'); D2fwd (5' TAT CGC GTG GGA CCG ATG GG 3') e D2rev (5' GGN ACT TGK SCR AAC TTT CC 3'). Esses oligonucleotídeos degenerados foram definidos a partir da análise das sequências ortólogas ao gene da beta-esterase-6 de outras 11 espécies do gênero *Drosophila* (*D. erecta*: FBgn0045004, *D. sechellia*: FBgn0023645, *D. simulans*: FBgn0012832, *D. yakuba*: FBgn0239133, *D. pseudoobscura*: FBgn0243549, *D. persimilis*: FBgn0021252, *D. melanogaster*: FBgn0000592, *D. mojavensis*: FBgn0145201, *D. virilis*: FBgn0197362, *D. grimshawi*: FBgn0123005, *D. ananassae*: FBgn0101803).

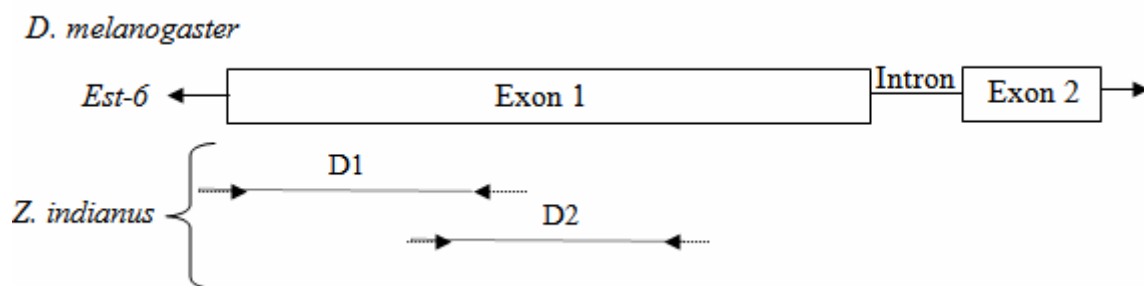


Figura 1. Representação esquemática do gene *Est-6* de *D. melanogaster*, composto por dois éxons e um íntron. As setas correspondem aos iniciadores descritos como D1 e D2 e as linhas tracejadas às sequências amplificadas pela reação de PCR utilizando-se o DNA genômico de machos de *Z. indianus*.

As reações de amplificação foram realizadas sob as seguintes condições: 200 ng de DNA genômico, 0,4 mM de cada dNTP, 2 mM $MgCl_2$, 0,4 μM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,025 U de Taq Platinum polimerase (Invitrogen) em tampão 1X. Para o iniciador D1 as reações de amplificação foram realizadas de acordo com a seguinte ciclagem: desnaturação a 95 °C por 5 minutos seguidos de 30 ciclos de 95 °C

por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos e finalmente extensão final a 72 °C por 10 minutos. Para o segundo par de oligonucleotídeos iniciadores (D2) foram utilizados 40 ciclos, mantendo-se as demais condições.

Após a reação de amplificação, as amostras foram purificadas usando o Kit *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) e reamplificadas (sense e antisense) com o marcador fluorescente para o sequenciamento (kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit - Applied Biosystems*). As sequências obtidas foram analisadas com auxílio do programa *BioEdit* (HALL, 1999) e alinhadas com o *ClustalW* (THOMPSON et al., 1994).

Análises evolutivas

A diversidade nucleotídica (π) foi calculada utilizando o programa DNASP (ROZAS; ROZAS, 1999). O número de substituições não sinônimas por sítios não sinônimos (dN), o de substituições sinônimas por sítios sinônimos (dS) e o Codon Based teste-Z foram calculados usando o método de Nei-Gojobori (1986), com os valores da distância p (MEGA 4.1.) Para verificar a pressão seletiva atuante nessas sequências foi calculada a razão dN/dS, onde $dN/dS = 1$, $dN/dS < 1$ e $dN/dS > 1$ representam evolução neutra, seleção purificadora e seleção positiva Darwiniana, respectivamente.

Foram reconstruídas as relações de parentesco entre as sequências nucleotídicas do gene *Est-6* das linhagens de *Z. indianus* e de espécies do gênero *Drosophila* que tiveram o genoma sequenciado. A árvore filogenética foi gerada com o auxílio do programa MEGA versão v.4.1 pelo método de *neighbor-joining* com 1.000 repetições, utilizando o método de distância Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980) e como grupos externos foram utilizadas sequências de esterases de *Anopheles gambiae* (AGAP005373) e *Aedes aegypti* (AAEL012509) depositadas no GenBank.

Resultados e Discussão

Diversidade genética do gene *Est-6*

Neste trabalho, foi sequenciada, em 19 linhagens de *Z. indianus*, uma região de 747 pb de um fragmento gênico, aqui considerado ortólogo ao *Est-6* de *D. melanogaster*

(Material Suplementar – Figura 2). A região sequenciada corresponde a 54% do tamanho éxon 1 de *D. melanogaster* e apresenta similaridade média nucleotídica e de aminoácidos, de 68% e 66%, respectivamente. Essa similaridade nucleotídica é comparável com a encontrada para outros genes considerados ortólogos ao gene *Est-6* de *D. melanogaster*, como o de *D. virilis*, 67% (SERGEEV et al., 1995) e *D. pseudoobscura*, 73% (BRADY et al., 1990; BRADY; RICHMOND, 1992). Brady e Richmond (1992) observaram ainda que *D. pseudoobscura* (*Est-5B*) apresenta uma sequência de mais de 200 pb a jusante do sítio de início da transcrição bastante divergente com regiões de alta similaridade do gene *Est-6* de não mais que 12 pb, as quais ocorrem em diferentes posições a partir do códon ATG. A sequência codificante de *Z. indianus*, comparada com a sequência de *D. melanogaster* é muito mais divergente no seu início que nas regiões subsequentes.

A árvore filogenética reconstruída neste trabalho demonstrou essa relação de ortologia (Figura 2). *Zaprionus indianus* apresentou um posicionamento atualmente aceito na família Drosophilidae, dentro do subgênero *Drosophila* (TROCKMORTON, 1962, 1975; PELANDAKIS; SOLIGNAC, 1993; KWIATOWSKI et al., 1994; KWIATOWSKI; AYALA, 1999), como um clado mais próximo das espécies do grupo *repleta*.

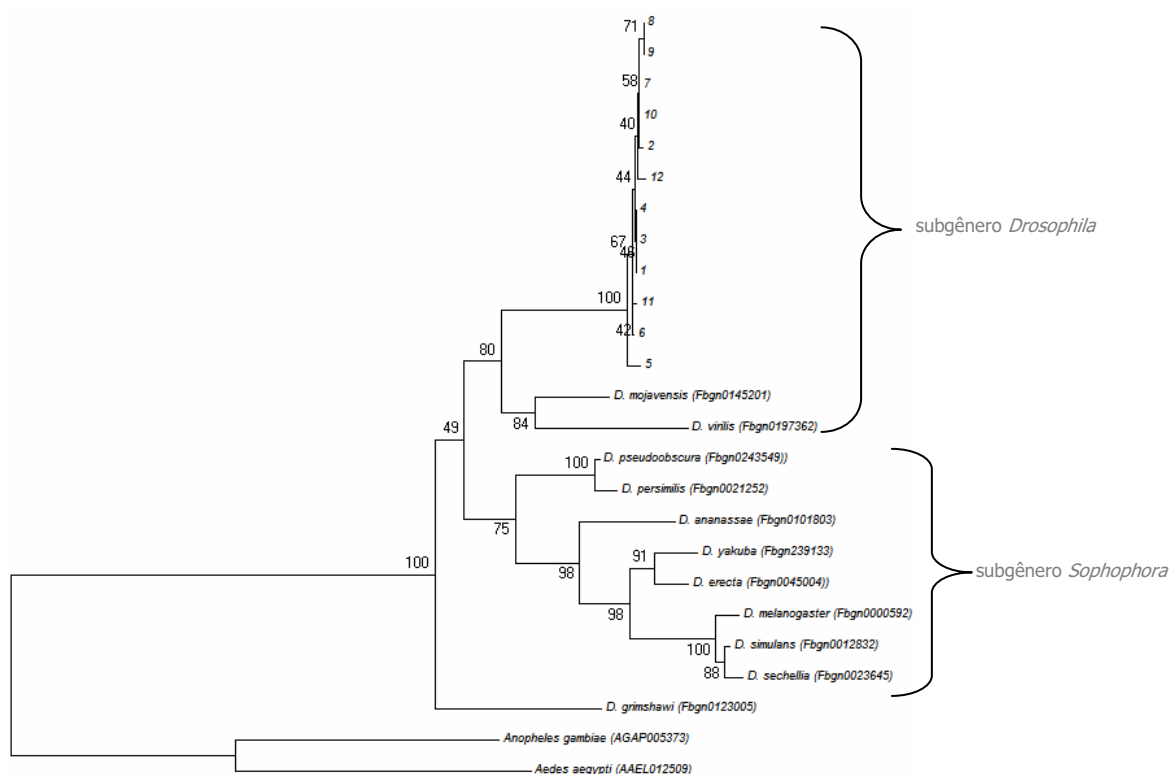


Figura 2. Árvore filogenética reconstruída com o método *Neighbor-Joining*, e distância Kimura 2-parâmetros (Kimura, 1980), utilizando as sequências nucleotídicas de linhagens de *Z. indianus* ortólogas a EST-6 de *D. melanogaster* (1- ST; 2- AB; 3- ALE; 4- HA; 5- DE; 6- FPA; 7- MA; 8- AR; 9- BR; 10- CE; 11- SM E 12- BH) e de espécies da família Drosophilidae. As sequências das esterases de *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti* foram utilizadas como grupo externo para a análise. O número nos ramos são valores de *bootstrap* obtidos em 1000 repetições.

O alinhamento das sequências de 747 pb do gene ortólogo ao *Est-6* de *D. melanogaster*, das 19 linhagens *Z. indianus*, das diferentes regiões geográficas permitiu identificar 12 haplótipos distintos (Figura 3). O maior número de haplótipos encontrados na América do Sul, em relação às outras regiões, está diretamente relacionado com uma maior amostragem.

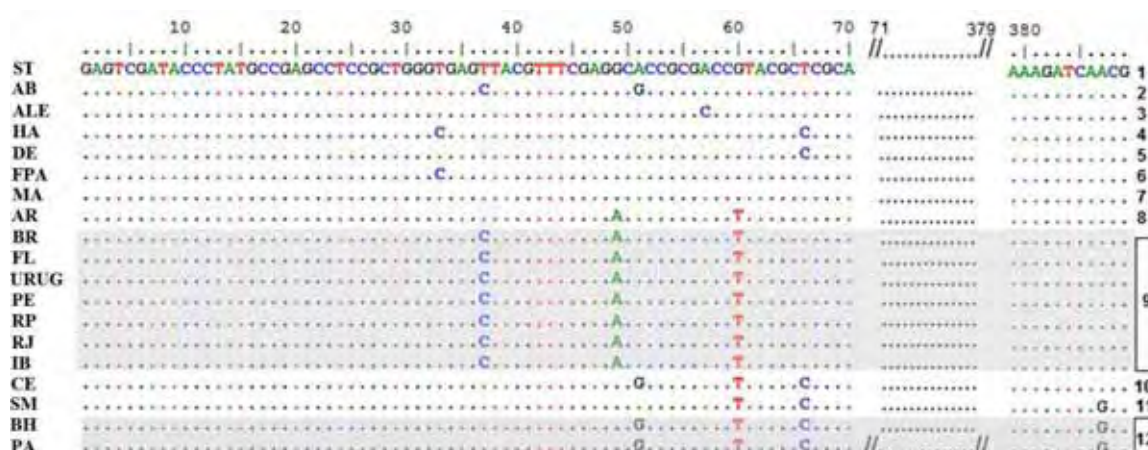


Figura 3. Alinhamento de uma região da sequência de 747 pb do gene ortólogo ao *Est-6* *D. melanogaster*, em 19 linhagens, evidenciando os 12 haplótipos distintos, identificados no lado direito da figura.

A diversidade nucleotídica do fragmento gênico foi de 0,021 (Tabela 2). Essa diversidade é evidenciada pela presença de 59 sítios polimórficos nas 19 linhagens de *Z. indianus* analisadas (Material Suplementar – Figura 2); desses, 90% originam substituições sinônimas e apenas 10% promovem alterações na sequência peptídica e, metade dessas, altera as características dos aminoácidos. As alterações envolvem modificações na carga elétrica, como também na polaridade dos aminoácidos.

A análise da diversidade nucleotídica acima descrita mostra que a região codificante do gene *Est-6* também é bastante polimórfica, como descrito em *D. pseudoobscura* (VEUILLE; KING, 1995) e *D. melanogaster* (BALAKIREV; AYALA, 2003b). Nessa espécie, a análise de 1.635 pb de oito linhagens permitiu identificar 54 sítios polimórficos, sendo que 34 substituições foram sinônimas (63%) e 20 não sinônimas (37%), entretanto, nesta espécie, a diversidade nucleotídica (0,0057) foi cerca de 3,5 vezes menor do que a observada nas linhagens de *Z. indianus*. Dois fatores podem ter influenciado esse resultado, o primeiro está relacionado com o tamanho do fragmento estudado, menor em *Z. indianus*, que estaria superestimando a diversidade nucleotídica total, se a sequência estudada for a mais diversa, assim como o tamanho populacional, desde que populações maiores podem acumular maior polimorfismo.

Os valores de dN e de dS (Material Suplementar – Tabela 1), calculados para estimar o modelo seletivo atuante sobre as sequências do fragmento gênico estudado (média de dN = 0,004 e de dS = 0,08) (Tabela 2), mostram que apesar da ocorrência de

substituições não sinônimas em diversos sítios, essas são 20 vezes menos frequentes do que as substituições sinônimas (média $dN/dS = 0,053$) indicando seleção negativa (purificadora) atuante sobre o gene ortólogo ao *Est-6* de *D. melanogaster* (Material Suplementar – Tabelas 2 e 3). Seleção purificadora também foi sugerida por Balakirev et al. (2006) na análise do *Est-6* em *D. melanogaster*.

A análise dos valores de dN e de dS mostraram algumas diferenças interessantes entre as sequências das populações ancestrais e as das invasoras. O valor médio de dN nas invasoras foi duas vezes maior que o das linhagens ancestrais, assim como a razão dN/dS (Tabela 2 e Material Suplementar – Tabelas 4 a 9). Apesar dessa diferença, esses valores indicam pressão seletiva purificadora atuando nas sequências do fragmento gênico ortólogo ao *Est-6* em ambos os grupos de linhagens, entretanto com pressão seletiva mais relaxada para o grupo das invasoras.

Tabela 2. Médias da diversidade nucleotídica (π), da taxa de substituições sinônimas por sítios sinônimos (dS), da taxa de substituições não-sinônimas por sítios não-sinônimos (dN) e da razão dN/dS para as populações ancestrais, invasoras e geral.

Grupos	π	dN	dS	dN/dS
Ancestral	0,021 ($\pm 0,0038$)	0,002 ($\pm 0,00116$)	0,083 ($\pm 0,01468$)	0,025 ($\pm 0,0126$)
Invasor	0,020 ($\pm 0,0009$)	0,004 ($\pm 0,00033$)	0,070 ($\pm 0,00425$)	0,058 ($\pm 0,0037$)
Geral	0,021 ($\pm 0,0006$)	0,004 ($\pm 0,0003$)	0,080 ($\pm 0,0034$)	0,053 ($\pm 0,0027$)

A Figura 4 (A e B) ilustra a distribuição das combinações par a par das razões dN/dS para as 19 linhagens. As razões das duas linhagens ancestrais quando comparadas com as das invasoras mostraram uma distribuição bastante similar (Figura 4A). Por outro lado, as comparações entre as sequências de linhagens invasoras entre si mostram diferenças particulares entre as combinações (Figura 4B). Por exemplo, Haifa, uma linhagem invasora antiga, quando comparada com as demais linhagens invasoras, apresentou razões dN/dS com os valores mais baixos, enquanto Delhi, também invasora antiga, apresentou razões mais elevadas. As diferenças entre as distribuições da razão dN/dS dessas linhagens são significantes ($F_{8,103} = 38,40$; $p = 0,000$). O teste de Tukey, que avalia a significância das diferenças das distribuições entre cada par de linhagens, indicou que as diferenças são, principalmente, entre Delhi e as demais combinações de linhagens.

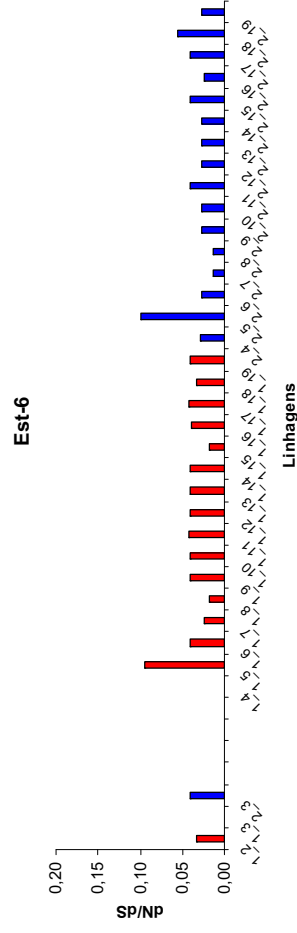
Para as outras linhagens com origem mais antiga (Alexandria e Abidjan - ancestrais e Haifa - invasora), as diferenças foram significantes apenas quando comparadas com as linhagens brasileiras de Florianópolis e de Santa Maria.

Os valores médios das comparações de dN/dS da linhagens de Alexandria, Abidjan e Haifa são os menores (0,02864 a 0,03751), indicando seleção purificadora mais forte nas linhagens mais antigas. Os valores das comparações das linhagens africanas e das brasileiras são os mais próximos (africanas: 0,034 e 0,037; brasileiras: 0,043 a 0,059) (Tabela 3).

Tabela 3. Médias e erros padrões das comparações par a par dos valores de dN/dS das linhagens geográficas de *Z. indianus* e correspondentes intervalos de confiança (95%), de acordo com os valores da Figura 4A e 4B, excluindo-se os valores não significantes.

Comparações par a par	N	Média	Erro padrão	Intervalo de Confiança (95%) para a média baseado no desvio padrão	
Alexandria	16	0,037	0,0049	(--*--)	
Abidjan	16	0,034	0,0050	(--*--)	
Haifa	14	0,028	0,0021	(--*--)	
Deli	15	0,109	0,0042		(--*--)
Ceará	10	0,043	0,0061	(--*--)	
Belo Horizonte	11	0,047	0,0014	(---*--)	
Florianópolis	8	0,058	0,0004	(----*--)	
Porto Alegre	11	0,047	0,0014	(---*--)	
Santa Maria	11	0,059	0,0047	(---*--)	
				-----+-----+-----+-----+-----	
				0,025 0,050 0,075 0,100	

A



B

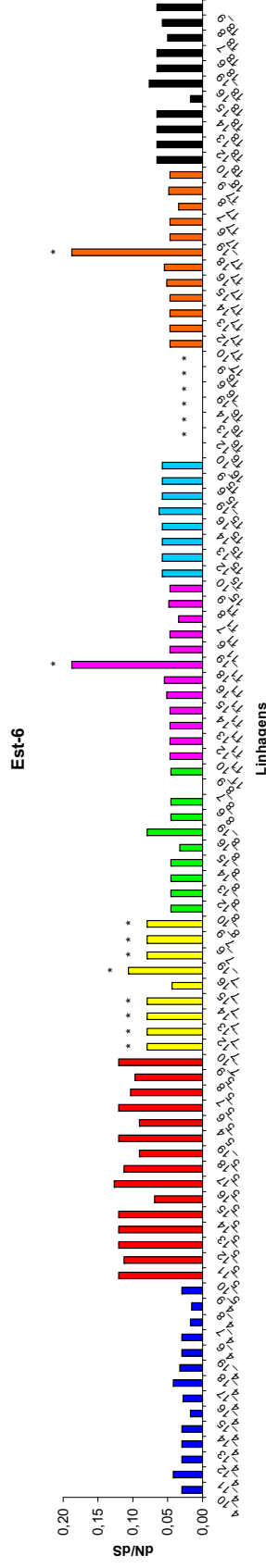


Figura 4. Comparações par a par para a razão dN/dS entre as seqüências do gene *Est-6* de *Z. indianus*. A: Linhagens ancestrais entre si e com as linhagens invasoras; B: Linhagens invasoras entre si. Os números indicados referem-se às linhagens: 1 - Alexandria, 2 - Abidjan, 3 - São Tomé, 4 - Haifa, 5 - Delhi, 6 - Flórida, 7 - Maranhão, 8 - Ceará, 9 - Pernambuco, 10 - Brasília, 11 - Belo Horizonte, 12 - São José do Rio Preto, 13 - Rio de Janeiro, 14 - Ilha Bela, 15 - Florianópolis, 16 - Aramaré, 17 - Porto Alegre, 18 - Santa Maria, 19 - Uruguai. Os asteriscos indicam os valores não significantes nas comparações par a par (Teste Z, $p < 0,05$).

Conclusão e perspectivas

Análises de sequências nucleotídicas de genes de esterases têm revelado alguns exemplos de como a seleção natural pode afetar a distribuição e a extensão da variação genética em *Drosophila* (KAROTAM et al., 1995). Essa ferramenta foi aqui utilizada para estabelecer a dinâmica evolutiva de *Z. indianus*, comparando a variabilidade genética de populações brasileiras, recentemente estabelecidas, com populações invasoras mais antigas (asiáticas) e ancestrais (africanas). A análise do polimorfismo de um fragmento gênico sequenciado, aqui considerado ortólogo ao da beta-esterase-6 de *D. melanogaster*, em 19 linhagens de *Z. indianus*, demonstrou seleção negativa atuando nesse fragmento gênico. As análises de diversidade não mostraram diferenças entre as sequências de populações ancestrais e de invasoras, assim como o teste de seleção, indicando o mesmo grau de pressão seletiva purificadora atuando nas sequências do fragmento gênico ortólogo ao *Est-6* em ambas.

Para um melhor detalhamento da atuação da seleção no gene ortólogo ao *Est-6* torna-se necessário o seu sequenciamento completo, pois pressões seletivas diferenciais podem atuar ao longo da sequência gênica, como demonstrado por Balakirev e Ayala (2003a). Além disso, a sequência completa desse gene ampliaria o conhecimento sobre a caracterização genética e bioquímica das esterases em *Z. indianus*, e possibilitaria estabelecer sua relação de similaridade com a esterase EST-6 de *D. melanogaster*.

Referências Bibliográficas

- ANANINA, G.; ROHDE, C.; DAVID, J.R.; VALENTE, V.L.; KLACZKO, L.B. Inversion polymorphism and a new polytene chromosome map of *Zaprionus indianus* Gupta (1970) (Diptera: Drosophilidae). **Genética**, v.131, p. 117-125, 2007.
- BALAKIREV, E. S.; BALAKIREV, E. I.; RODRIGUEZ-TRELLES, F.; AYALA, F. J. Molecular evolution of two linked genes, *Est-6* and *Sod*, in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 153, p. 1357-1369, 1999.
- BALAKIREV, E. S.; BALAKIREV, E. I.; AYALA, F. J. Molecular evolution of the *Est-6* gene in *Drosophila melanogaster*: contrasting patterns of DNA variability in adjacent functional regions. **Gene**, v. 288, p. 167-177, 2002.
- BALAKIREV, E. S.; AYALA, F. J. Nucleotide variation of the *Est-6* gene region in natural populations of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v.165, p. 1901-1914, 2003a.
- BALAKIREV, E. S.; AYALA, F. J. Molecular population genetics of the β -esterase gene cluster of *Drosophila melanogaster*. **J. Genet.**, v.82, p.115–131, 2003b.
- BALAKIREV, E. S.; CHECHETKIN, V.R.; LOBZIN, V.V.; AYALA, F.J. Entropy and GC content in the β -esterase gene cluster of *Drosophila melanogaster* subgroup. **Mol. Biol. Evol.**, v.22, p. 2063-2072, 2005.
- BALAKIREV, E. S.; ANISIMOVA, M.; AYALA, F. J. Positive and negative selection in the β -esterase gene cluster of the *Drosophila melanogaster* subgroup. **J. Mol. Evol.**, v. 62, p. 496-510, 2006.
- BRADY, J. P.; RICHMOND, R. C.; OAKESHOTT, J. G. Cloning of the esterase-5 locus from *Drosophila pseudoobscura* and comparison with its homologue in *D. melanogaster*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 7, p. 525-546, 1990.
- BRADY, J. P.; RICHMOND, R. C. Molecular analysis of evolutionary changes in the expression of *Drosophila* esterases. **Proc. Nat. Acad. Sci.** v. 87, p. 8217-8221, 1992.
- BRADY, J. P.; RICHMOND, R. C. An Evolutionary Model for the Duplication and Divergence of Esterase Genes in *Drosophila*. **J. Mol. Evol.** v.34, p.506–521, 1992b.
- COMMAR et al. The intercontinental dispersion scenario of drosophilid *Zaprionus indianus* revealed by mitochondrial and nuclear markers. **Biological Invasion**, (2011, submitted).
- COOKE, P. H.; OAKESHOTT, J. G. Amino-acid polymorphisms for esterase-6 in *Drosophila melanogaster*. **Proc. Nat Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 1426-1430, 1989.

- DANIELS, S. B.; STRAUSBAUGH, L. D. The distribution of P-element sequences in *Drosophila*: the *willistoni* and *saltans* species groups. **J. Mol. Evol.**, v. 23, p. 138-148, 1986.
- DAVID, J.R; ARARIPE, L.O; BITNER-MATHE, B.C; CAPY, P.; GONI, B.; KLACZO, L.B.; LEGOUT, H.; MARTINS, M.B.; VOUIDIBIO, J.; YASSIN, A.; MORETEAU, B. Sexual dimorphism of body size and stenopleuroral bristle number: a comparison of geographic population of an invasive cosmopolitan drosophilid. **Genetica**, v. 128, p.109-122, 2006a.
- DAVID, J.R; ARARIPE, L.O; BITNER-MATHE, B.C; CAPY, P.; GONI, B.; KLACZO, L.B.; LEGOUT, H.; MARTINS, M.B.; VOUIDIBIO, J.; YASSIN, A.; MORETEAU, B. Quantitative trait analyses and geographic variability of natural populations of *Zaprionus indianus*, a recent invader in Brazil. **Heredity**, v.96, n.1, p-53-62, 2006b.
- EAST, P. D.; GRAHAM, A.; WHITINGTON, G. Molecular isolation and preliminary characterization of a duplicated esterase locus in *Drosophila buzzatii*. In **Ecological and evolutionary genetics of Drosophila**, Plenum, p. 389–406, 1990.
- GALEGO L. G; CERON C. R; CARARETO, C. M. Characterization of esterases in a Brazilian population of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). **Genetica**, v. 126, p. 89-99, 2006.
- GALEGO L. G; CERON C. R; CARARETO, C. M. Analysis of the drosophilid *Zaprionus indianus* introduction in Brazil: contribution of esterase loci polymorphisms. **Dros. Inf. Serv.**, v.90, p.79-84, 2007.
- GAME, A. Y.; OAKESHOTT, J. G. Associations between restriction site polymorphism and enzyme activity variation for esterase 6 in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v.126, p.1021-1031, 1990.
- GROMKO, M. H.; GILBERT, D. F.; RICHMOND, R. C. Sperm transfer and use in the multiple mating system of *Drosophila*. In **Sperm competition and the evolution of animal mating systems**, Academic Press, p. 371–426, 1984.
- HALL, T.A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. **Nucl. Acid. Symp. Ser.**, v.41, p.95-98, 1999.
- KAROTAM, J.; BOYCE, T. M.; OAKESHOTT, J. G. Nucleotide variation at the hypervariable esterase 6 isozyme locus of *Drosophila simulans*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 12, p.113–122, 1995.
- KIMURA M. 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.

KWIATOWSKI, J.; SKARECKY, D.; BAILEY, K.; AYALA, F.J. Phylogeny of *Drosophila* and related genera inferred from the nucleotide sequence of the Cu, Zn Sod gene. **J. Mol. Evol.**, v.38, p.443–454, 1994.

KWIATOWSKI, J.; AYALA, F.J. Phylogeny of *Drosophila* and related genera: conflict between molecular and anatomical analyses. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.13, p.319–328, 1999.

NEI, M.; GOJOBORI, T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. **Molecular Biology and Evolution**. v.3, p.418–426, 1986.

OAKESHOTT, J.G.; HEALY, M.J.; GAME, A.Y. Regulatory evolution of the beta carboxylesterases in *Drosophila*. In: BARKER JSF; STARMER, W.T.; Macintyre, R.J. (eds) Ecological and evolutionary genetics of *Drosophila*. **Plenum Press**, p. 359–387, 1990.

OAKESHOTT, J. G.; van PAPENRECHT, E. A.; BOYCE, T. M.; HEALY, M. J.; RUSSELL, R. J. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. **Genetica**, v. 90, p. 239–268, 1993.

OAKESHOTT, J. G.; SAAD, M.; GAME, A.Y.; HEALY, M.J. Causes and consequences of esterase 6 enzyme activity variation in pre-adult *Drosophila melanogaster*. **Heredity**, v.73, p. 160–169, 1994.

OAKESHOTT, J. G.; BOYCE, T. M.; RUSSELL, R. J.; HEALY, M. J. Molecular insights into the evolution of an enzyme; esterase 6 in *Drosophila*. **Trends Ecol. Evol.**, v.10, p.103–110, 1995.

PELANDAKIS, M.; SOLIGNAC, M. Molecular phylogeny of *Drosophila* based on ribosomal RNA sequences. **J. Mol. Evol.**, v.37, p.525–543, 1993.

RICHMOND, R.C.; GILBERT, D.G.; SHEEHAN, K.B.; GROMKO, M.H.; BUTTERWORTH, F.M. Esterase 6 and reproduction in *Drosophila melanogaster*. **Science**, v.207, p. 1483–1485, 1980.

RICHMOND, R.C. ; NIELSEN, K.M.; BRADY, J.P.; SNELLA, E.M. Physiology, biochemistry and molecular biology of the *Est-6* locus in *Drosophila melanogaster*. Barker JSF, Starmer WT, MacIntyre RJ (eds) Ecology and evolutionary genetics of *Drosophila*. **Plenum Press**, p. 273–292, 1990

RICHMOND, R.C.; SENIOR, A. Esterase 6 of *Drosophila melanogaster*: kinetics of transfer to females, decay in females and males recovery. **J. Insect Physiol.**, v. 27, p. 849–853, 1991.

ROZAS, J.; ROZAS, R. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. **Bioinformatics**, v. 15, p. 174–175, 1999.

SERGEEV, P. V.; PANIN, V.M.; PALVLOVA, G.V.; KOPANTSEVA, M.R.; SHOSTAK, N.G.; BASHKIROV, V.N.; GEORGIEV, G.P.; KOROCHKIN, L.I. The expression of esterase S gene of *Drosophila virilis* in *Drosophila melanogaster*. **FEBS Letters**, v. 360, p. 194-196, 1995.

SHEEHAN, K.; RICHMOND, R. C.; COCHRANE, B. J. Studies of esterase-6 in *Drosophila melanogaster*. III. The developmental pattern and tissue distribution. **Insect Biochem.**, v. 9, p. 443-450, 1979.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.4673–4680, 1994.

THROCKMORTON, L.H. Problem of Phylogeny in the Genus *Drosophila*. **Univ. Texas Publ.**, v.6205, p.207–344, 1962.

THROCKMORTON, L.H. The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila*. In: R.C. King, Editor, **Handbook of Genetics**, Plenum Press, New York, v.3, p.421–469, 1975.

TSACAS, L. *Zaprionus* Gupta, 1970 nouveau nom pour le plus commun des *Zaprionus africains* (Diptera: Drosophilidae). **Annls. Soc. Ent. Fr.**, v. 21, p. 343-344, 1985.

VEUILLE, M.; KING, M.L. Molecular Basis of Polymorphism at the Esterase-5B Locus in *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics Society of America**. v. 141, p. 255-262, 1995.

VILELLA, C. R. Is *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae) currently colonizing the Neotropical region? **Drosophila Inf. Serv.**, v. 82, 1999.

WRIGHT, T.R.F.; The genetic control of an esterase in *Drosophila melanogaster*. **Am. Zool.**, v.1, p.476, 1961.

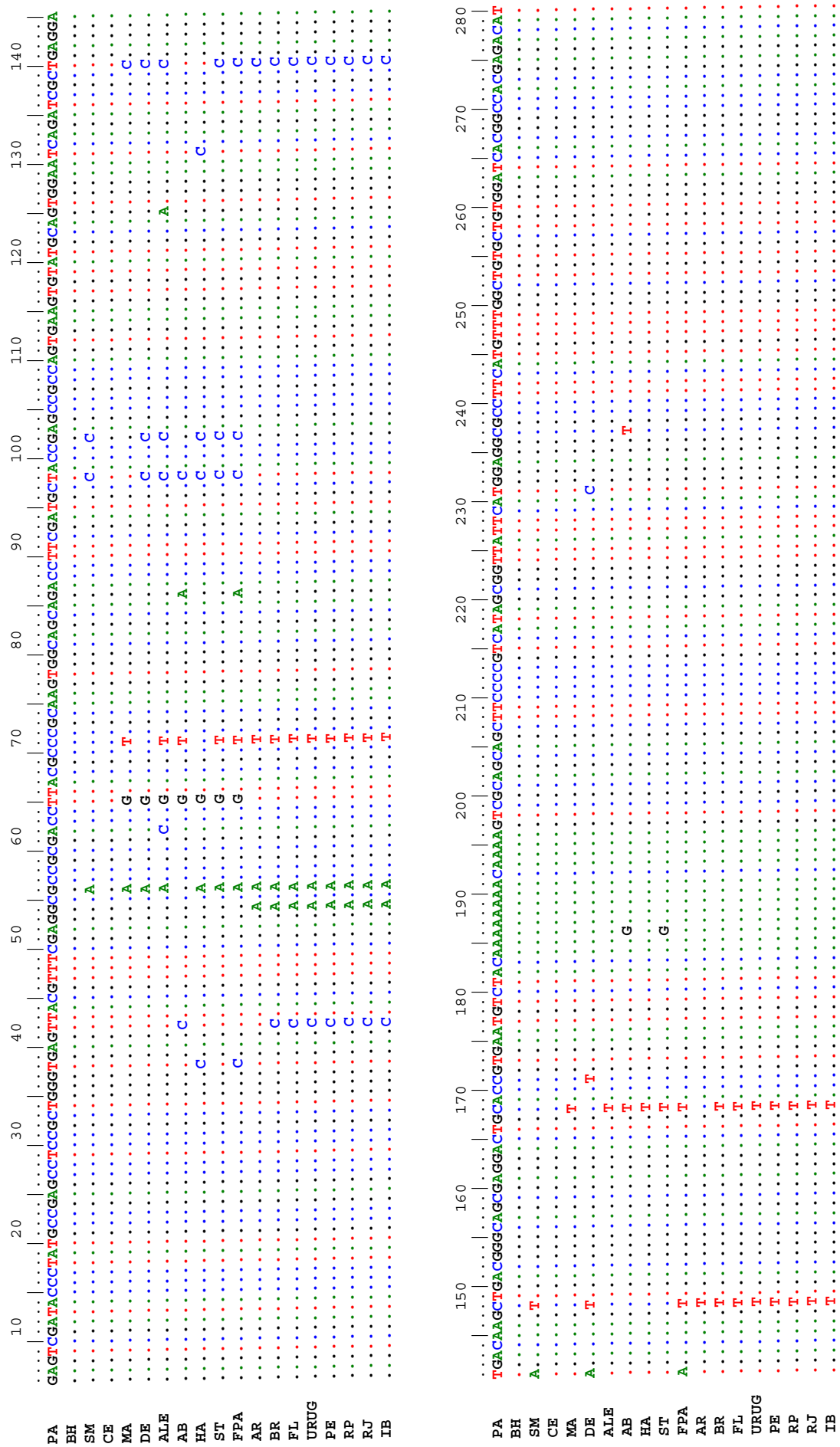
YENIKOLOPOV, G. N.; MALEVANTSCHUK, O. A.; PEUNOVA, N. I.; SERGEEV, P. V.; GEORGIEV, G. P. *Est* locus of *Drosophila virilis* contains two related genes. **Dokl. Acad. Nauk SSSR**, v. 306, p.1247–1249, 1989.

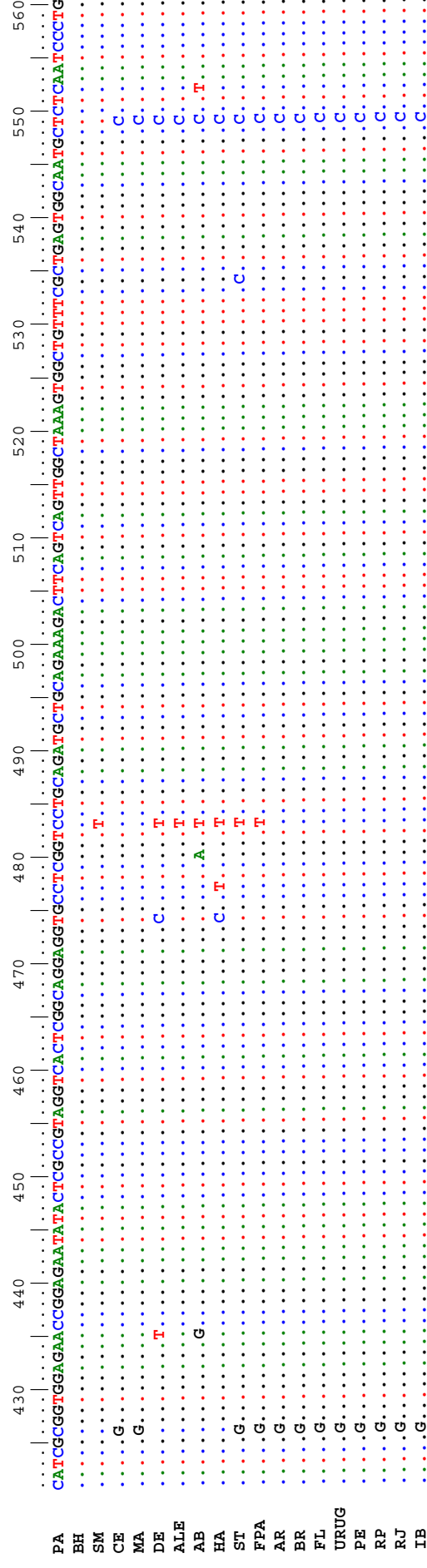
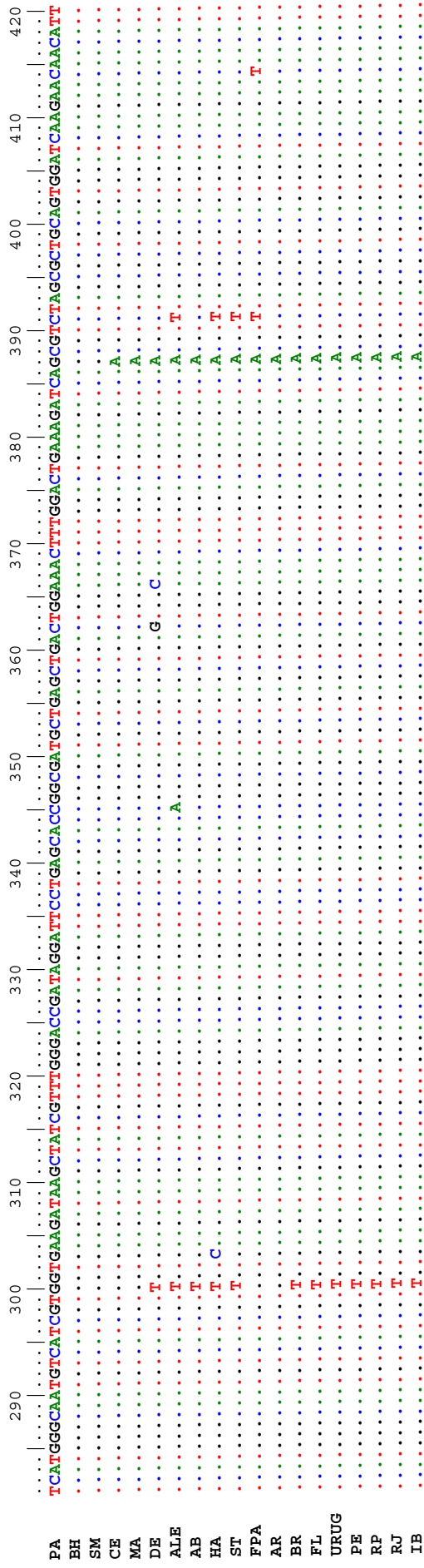
Material Complementar



Figura 1. Mapa mundi parcial indicando a localização geográfica das dezenove populações de *Z. indianus* originárias da África (Abidjan, AB; São Tomé, ST; Alexandria, ALE); da Ásia (Haifa, HA; Delhi, DE) e Américas (Uruguai, URUG; Porto Alegre, PA; Arambaré, AR; Santa Maria, SM; Florianópolis, FPA; Ilha Bela, IB; Rio de Janeiro, RJ; Belo Horizonte, BH; São José do Rio Preto, RP; Brasília, BR; Pernambuco, PE; Ceará, CE; Maranhão, MA e Flórida, FL).

Figura 2. Polimorfismo de DNA das sequências de 747 pb do gene *ortólogo* ao da β -esterase-6 de *D. melanogaster*, em dezenove populações de *Z. indianus* originárias da África: Abidijan (AB), São Tomé (ST), Alexandria (ALE); Ásia: Haifa (HA), Delhi (DE); Américas: Belo Horizonte (BH), Ceará (CE), Pernambuco (PE), Maranhão (MA), Brasília (BR), São José do Rio Preto (RP), Rio de Janeiro (RJ), Ilha Bela (IB), Porto Alegre (PA), Arambaré (AR), Santa Maria (SM), Florianópolis (FPA), Uruguai (URUG) e Flórida (FL).





PA
 BH
 SM
 CE
 MA
 DE
 ALE
 AB
 HA
 ST
 FPA
 AR
 BR
 FL
 URUG
 PE
 RP
 RJ
 IB

Tabela 2. Valores da razão dN/dS entre as 19 populações de *Z. indianus*. As células destacadas apresentam valores significantes (Teste Z, $p < 0,05$) na comparação par a par.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
11.PA																			
2.BH	-																		
3.SM	0,187279152	0,187279																	
4.CE	0,047683924	0,047684	0,058499																
5.MA	0,034444819	0,034449	0,049302	0															
6.DE	0,112089672	0,11209	0,090909	0,097312326	0,10274														
7.ALE	0,042502005	0,042502	0,032407	0,017647059	0,024423	0,095395													
8.AB	0,040863531	0,040864	0,05627	0,013303769	0,013878	0,098558	0,032528												
9.HA	0,042570281	0,04257	0,032437	0,01590106	0,016744	0,090909	0	0,028135											
10.ST	0,046861185	0,046861	0,036307	0,018730489	0,02651	0,096703	0	0,041322	0										
11.FPA	0,051470588	0,051471	0,016667	0,032527881	0,044136	0,068226	0,018614	0,040707	0,016667	0,019824									
12.AR	0,055150884	0,055151	0,077178	0,079646018	0,105882	0,127198	0,038504	0,023826	0,028045	0,041176	0,06228								
13.BR	0,046944198	0,046944	0,065116	0,04556962	0,079646	0,120352	0,041176	0,026985	0,029437	0,044192	0,058434	0							
14.FL	0,046944198	0,046944	0,065116	0,04556962	0,079646	0,120352	0,041176	0,026985	0,029437	0,044192	0,058434	0	-						
15.URUG	0,046944198	0,046944	0,065116	0,04556962	0,079646	0,120352	0,041176	0,026985	0,029437	0,044192	0,058434	0	-	-					
16.PE	0,046944198	0,046944	0,065116	0,04556962	0,079646	0,120352	0,041176	0,026985	0,029437	0,044192	0,058434	0	-	-	-				
17.RP	0,046944198	0,046944	0,065116	0,04556962	0,079646	0,120352	0,041176	0,026985	0,029437	0,044192	0,058434	0	-	-	-	-			
18.RJ	0,046944198	0,046944	0,065116	0,04556962	0,079646	0,120352	0,041176	0,026985	0,029437	0,044192	0,058434	0	-	-	-	-	-		
19.IB	0,046944198	0,046944	0,065116	0,04556962	0,079646	0,120352	0,041176	0,026985	0,029437	0,044192	0,058434	0	-	-	-	-	-	-	

Tabela 4. Valores de dS (abaixo) e de dN (acima) de comparações par a par entre as 3 populações ancestrais de *Z. indianus*, utilizando a distância p de Nei-Gojobori.

	1	2	3
1.ALE	-	0,0035	0,0000
2.AB	0,1076	-	0,0035
3.ST	0,0568	0,0847	-

Tabela 5. Valores da razão dN/dS entre as 3 populações ancestrais de *Z. indianus*. As células destacadas apresentam valores significantes (Teste Z, $p < 0,05$) na comparação par a par.

	1	2
1.ALE		
2.AB	0,033	
3.ST	0	0,041322

Tabela 6. Teste Codon-based de Neutralidade (acima) e os valores de p-value (abaixo). O teste foi realizado, para 3 populações ancestrais de *Z. indianus*, utilizando a hipótese nula de neutralidade (dN = dS) e a distância pelo método de Nei-Gojobori. Células destacadas apresentam valores significantes ($p < 0,05$) na comparação par a par.

	1	2	3
1.ALE	-	-4,4162	-3,2269
2.AB	0,0000	-	-3,8784
3.ST	0,0016	0,0002	-

Tabela 8. Valores da razão dN/dS entre as 14 populações invasoras de *Z. indianus*. As Células destacadas apresentam valores significantes (Teste Z, $p < 0,05$) na comparação par a par.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1.DE															
2.HA	0,091														
3.PA	0,112	0,04257													
4.BH	0,112	0,04257	-												
5.SM	0,091	0,032437	0,187279	0,187279											
6.CE	0,097	0,015901	0,047684	0,047684	0,058499										
7.MA	0,103	0,016744	0,034449	0,034449	0,049302	0									
8.FPA	0,068	0,016667	0,051471	0,051471	0,016667	0,032528	0,044136								
9.AR	0,127	0,028045	0,055151	0,055151	0,077178	0,079646	0,105882	0,06228							
10.BR	0,12	0,029437	0,046944	0,046944	0,065116	0,04557	0,079646	0,058434	0						
11.FL	0,12	0,029437	0,046944	0,046944	0,065116	0,04557	0,079646	0,058434	0	-					
12.URUG	0,12	0,029437	0,046944	0,046944	0,065116	0,04557	0,079646	0,058434	0	-	-				
13.PE	0,12	0,029437	0,046944	0,046944	0,065116	0,04557	0,079646	0,058434	0	-	-	-			
14.RP	0,12	0,029437	0,046944	0,046944	0,065116	0,04557	0,079646	0,058434	0	-	-	-	-		
15.RJ	0,12	0,029437	0,046944	0,046944	0,065116	0,04557	0,079646	0,058434	0	-	-	-	-	-	
16.IB	0,12	0,029437	0,046944	0,046944	0,065116	0,04557	0,079646	0,058434	0	-	-	-	-	-	-

4. CAPÍTULO II

Editorial Manager(tm) for Biological Invasions
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: The intercontinental dispersion scenario of drosophilid *Zaprionus indianus* revealed by mitochondrial and nuclear markers.

Article Type: Research paper

Keywords: *Zaprionus indianus* dispersion; insect colonization; fig fly; Drosophilidae.

Corresponding Author: Claudia Marcia Carareto, PdD

Corresponding Author's Institution:

First Author: Leliane Silva Commar, Master in Science

Order of Authors: Leliane Silva Commar, Master in Science; Carlos Roberto Ceron, PhD; Claudia Marcia Carareto, PdD

Abstract: The *Zaprionus* genus belongs to Drosophilidae family, one of the most numerous and widely distributed families of Diptera order. One of its most common representatives, the African origin species *Zaprionus indianus*, is frequently found in various tropical regions; in Brazil, it was first reported in the state of São Paulo. It has been proposed that the dispersion of *Z. indianus* occurred temporarily from Africa to Asia, South America and North America, probably due to international fruit trading, but the species dispersion route was not totally established. This study was developed considering 19 *Z. indianus* population samples from South America, North America, Asia and Africa, from which a possible dispersion route was drawn. For this, a haplotype network was built using the median-joining network method, and utilizing a mitochondrial (cytochrome oxidase I) and a nuclear (ortholog of beta-esterase-6 gene from *D. melanogaster*) marker. The data here presented have not only complied with the proposition of *Z. indianus* African origin, but also brought original information about this species' dispersion process in the different continents, thus revealing the occurrence of two invasions in Brazil, instead of only one previously suggested, as well as the fact that the invasion in North America happened from migrating individuals from Brazilian populations, rather than African or Asian.

The intercontinental dispersion scenario of drosophilid *Zaprionus indianus* revealed by mitochondrial and nuclear markers.

Leliane Silva Commar

UNESP – University of São Paulo State, Genetics Program / São José do Rio Preto, SP, Brazil

e-mail: commar_ls@yahoo.com.br

Carlos Roberto Ceron

UNESP – University of São Paulo State, Environmental Sciences and Chemistry Department/ São José do Rio Preto, SP, Brazil

e-mail: ceron@ibilce.unesp.br

Claudia Marcia Aparecida Carareto2

UNESP – University of São Paulo State / Biology Department / São José do Rio Preto, SP, Brazil

e-mail: carareto@ibilce.unesp.br

phone: (17) 3221- 2382/ (fax) 3221-2390

Abstract: The *Zaprionus* genus belongs to Drosophilidae family, one of the most numerous and widely distributed families of Diptera order. One of its most common representatives, the African origin species *Zaprionus indianus*, is frequently found in various tropical regions; in Brazil, it was first reported in the state of São Paulo. It has been proposed that the dispersion of *Z. indianus* occurred temporarily from Africa to Asia, South America and North America, probably due to international fruit trading, but the species dispersion route was not totally established. This study was developed considering 19 *Z. indianus* population samples from South America, North America, Asia and Africa, from which a possible dispersion route was drawn. For this, a haplotype network was built using the median-joining network method, and utilizing a mitochondrial (cytochrome oxidase I) and a nuclear (ortholog of beta-esterase-6 gene from *D. melanogaster*) marker. The data here presented have not only complied with the proposition of *Z. indianus* African origin, but also brought original information about this species' dispersion process in the different continents, thus revealing the occurrence of two invasions in Brazil, instead of only one previously suggested, as well as the fact that the invasion in North America happened from migrating individuals from Brazilian populations, rather than African or Asian.

Keywords: *Zaprionus indianus* dispersion; insect colonization; fig fly; Drosophilidae.

INTRODUCTION

Zaprionus indianus (Gupta 1970) is a Diptera from Drosophilidae family, *Zaprionus* subgenus, constituted of 44 essentially Afro-tropical species (Chassagnard and Tsacas 1993; Chassagnard 1996). The interest in the study of this species was motivated mainly by its invasion in Neotropical regions, and it is considered today a semi cosmopolitan species (Vilela 1999; Tidon et al. 2003; Silva et al. 2005). *Z. indianus* has generalist ecological characteristics (Parkash and Yadav 1993) which can be related to the large number of fruit plants used as reproduction and feeding locals (Lachaise and Tascas 1983; Goñi et al. 2001; Raga 2002; van der Linde et al. 2006). Such ecological diversity could be the reason of the species' dispersion success.

Zaprionus indianus have dispersed through many countries, initially in Asia (Gupta 1970; Amoudi 1993; Parkash and Yadav 1993, Karan et al. 2000) and recently in the Americas (Goñi et al. 2001; Tidon et al. 2003; van der Linde et al. 2006). The colonization process in Asia was not properly documented and few studies with populations from this continent have focused on the invasive aspect of the drosophilid. The registers related to *Z. indianus* in Asia are mainly studies involving alo-enzymatic polymorphisms and quantitative traits, which indicate a cline variation. Karan et al. (2000) detected a statistically significant increase in several quantitative (weight, wing size, body size) and reproductive (number of ovarioles) traits, according to latitude increase. Parksh and Yadav (1993) detected a cline esterase polymorphism distribution pattern in different Indian populations in accordance to latitude. All these data point to an ancient colonization in Asia by *Z. indianus* which may have occurred over 30 years ago (David et al., 2006a) considering a description by Gupta (1970), or even centuries ago (Karan et al. 2000).

On the contrary, the introduction in the Americas, which is recent, is well documented. Many studies were carried out and several moments of the invasive process were registered. Amongst the markers in these studies, the alo-enzymatic polymorphisms, quantitative characters, mtDNA, and even total genome were distinguished. Its introduction in the American continent happened firstly in Brazil, reported in March, 1999, when adult individuals were collected in the metropolitan region of São Paulo (Vilela 1999). Since then its expansion has progressed in a quick and alarming way, as it was first considered fruit plague, especially fig plague, and within a five year period it was found in practically all Brazilian states (Toni et al. 2001; Tidon et al. 2003; Santos et al. 2003; Kato et al. 2004; Machado et al. 2005; Loh and Bitner-Mathé 2005) and other South America countries, such as Uruguay (Goñi et al. 2001, 2002). Its first appearance in North America, in Florida (USA) was reported in 2005 (Linde et al. 2006).

It has been proposed that *Z. indianus* dispersion occurred temporarily from Africa to Asia, South America (Vilela 2001; Loh and Bitner-Mathé 2005; David et al. 2006ab; Ananina et al. 2007; Galego et al. 2007, 2010), and North America, probably due to international fruit trading, but the species dispersion route was not completely established. In this work, the polymorphism of a mitochondrial marker (cytochrome oxidase I) and of a nuclear one (ortholog of the Est-6 gene from *D. melanogaster*), were utilized as a tool to verify this species' dispersion pattern from its origin (Africa) to the rest of the world. Our data corroborate the African origin of *Z. indianus* (Ananina et al. 2007; David et al. 2006ab; Galego et al. 2007, 2010), revealing, however, a more complex process than the previously suggested one, at least 2 introductions in Brazil, instead of only one. Additionally, the haplotype network also permits to

suggest that the species' dispersion to North America had occurred from Brazilian populations' migrants, not African or Asian's ones.

MATERIAL AND METHODS

Zaprionus indianus lineages

Nineteen strains of *Z. indianus* from different localizations were used in this study (Table 1 and Supplementary Material – Figure 1). They were classified as ancestors or invaders (ancient - the Asian origin ones, and recent - the ones originated from the Americas) according to place of origin and literature reports.

Table 1

DNA Extraction, amplification, and sequencing

Thirty males from each population were utilized to obtain DNA. Genomic DNA was isolated in agreement with Daniels and Strausbaugh (1986), with some modifications.

A 612 pb fragment of cytochrome oxidase I mitochondrial gene (COI) was amplified utilizing the pair of oligonucleotide primers LCO-J-1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TAT TGG – 3') and HCO-N-2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAA TCA – 3') designed by Folmer et al. (1994). Mitochondrial marker sequences (COI) amplification reactions were carried out under the following conditions: 200 ng of genomic DNA, 0.4 mM of each dNTP, 2mM MgCl₂, 0.4 μM of each initiator oligonucleotides, 0.025 U of Taq Platinum polymerase (Invitrogen) in buffer 1X. The amplification reactions were carried out with the following cycling: denaturation at 95°C for 3 minutes followed by 35 cycles of 94°C for a minute, 50 °C for a minute; 72°C for 2 minutes, and final extension at 72 °C for 10 minutes.

Additionally, two pairs of oligonucleotide primers were designed to amplify a fragment equivalent to 747 pb of the ortholog of beta-esterase 6 gene from *D. melanogaster*, denominated D1fwd (5'ARB TDC GTG GTC GCG ATA AYG 3') and D1rev (5'TAC GGC GAG TAT ATT CTC CGG 3'); and D2fwd (5'TAT CGC GTG GGA CCG ATG GG3') and D2rev (5'GGN ACT TGK SCR AAC TTT CC 3'). These degenerated oligonucleotides were defined through analyzing ortholog sequences of beta-esterase 6 gene of other 11 described species belonging to the genus *Drosophila* (*D. erecta*: FBgn0045004, *D. sechellia*: FBgn0023645, *D. simulans*: FBgn0012832, *D. yakuba*: FBgn0239133, *D. pseudoobscura*: FBgn0243549, *D. persimilis*: FBgn0021252, *D. melanogaster*: FBgn0000592, *D. mojavensis*: FBgn0145201, *D. virilis*: FBgn0197362, *D. grimshawi*: FBgn0123005, *D. ananassae*: FBgn0101803). The PCR mix had the same concentration as the one used for mitochondrial marker. Amplification reactions of Est-6 gene sequences were carried out under the following conditions: 200ng of genomic DNA, 0.4mM of each dNTP, 2 mM MgCl, 0.4 μM of each primer, 0.025 U of Taq Platinum polymerase (Invitrogen) in buffer 1X. For primer D1, the amplification were made according to the following cycling: denaturation at 95°C for 5 minutes

1
2
3
4 followed by 30 cycles of 95°C for 1 minute, 50°C for 1 minute, 72°C for 2 minutes, and eventually, final extension
5 at 72°C for 10 minutes. For the second pair of initiator oligonucleotides (D2) 40 cycles were utilized, maintaining
6 the other conditions. After amplification reactions, samples were purified using the kit GFX™ PCR DNA and Gel
7 Band Purification (GE Healthcare), and re-amplified (sense and antisense) with the fluorescent marker for the
8 sequencing (kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit - Applied Biosystems*). The obtained sequences were
9 analyzed with the help of *BioEdit* (Hall, 1999) and aligned with *ClustalW* (Thompson et al. 1994).

15 16 **Evolutionary analysis**

17
18 In order to determine a possible dispersion route for *Z. indianus* in different geographic regions, haplotype networks
19 were built using the sequences obtained of a 612 pb fragment of mitochondrial marker (COI), and a 747 pb fragment
20 of ortholog of beta-esterase 6 gene from the 19 strains *D. melanogaster* listed in Table 1. The reconstructions were
21 performed using DNA Alignment 1.3.0.1 and NETWORK 4.5.1.0 software available at the Fluxus Technology Ltd.
22 Website (<http://www.fluxus-engineering.com>). 'MP calculation' was applied for post-processing the networks, the
23 characters were equally weighted, and the other median-joining parameters followed the software default.

28 **Table 1**

32 33 **RESULTS AND DISCUSSION**

34
35 The dispersion of *Z. indianus* throughout the world is directly related to international fruit trading (Galego et al.
36 2010). In an attempt to reconstruct the history of this species' colonization on the continents, polymorphism was
37 analyzed in two genetic markers (mitochondrial and nuclear) in several geographic populations. These markers
38 permitted the design of the dispersion scenario from Africa, which is the species' origin, to some regions of Asia,
39 but mainly its recent dispersion to the South and North Americas.

44 45 **Mitochondrial Genes Haplotype Network (COI)**

46 Haplotype network obtained from COI marker has demonstrated African lineage grouping, sharing ancestral
47 sequences represented by median vectors, which correspond to a hypothetical (in theory ancestral) or unsampled
48 sequences (Fig. 1). In this phylogenetic network a sharing of an ancestral node between Alexandria and Haifa
49 haplotype can be observed. A possible explanation for this could be geographic proximity between Alexandria
50 (Egypt) and Haifa, which suggests that gene flux amongst populations may be occurring. Many *Drosophilid* in
51 Egypt have been introduced from neighboring countries (Africa, Asia, and Europe) and such population seems to be
52 recent, after December 2002 (Yassin et al. 2009). This introduction can be the result of a Northern Africa natural
53 expansion through either Nile valley, or Oriental Africa or Asia fruit trading (Yassin et al. 2009). Chromosomal
54 inversion polymorphism analyses have shown that populations from Alexandria (Egypt) are more related to Indian
55 populations (Gupta and Kumar 1987) due to the dominant presence of an inversion in relation to African populations

(Elias 2005) and Brazilian ones (Ananina et al. 2007). Studies of quantitative analyses, allo-enzymes, and RAPD have shown low genetic variability in populations of *Z. indianus* (Yassin et al. 2009), which characterizes recently introduced populations, as reported in the case of *Z. indianus* populations in Egypt.

In the phylogenetic network, haplotype sharing amongst Brazilian populations can also be observed; however, this gathering did not permit to determine a *Z. indianus* probable route (or predictable route) around several Brazilian regions. The evidence was the presence of distinct ancestral haplotypes directly related to the sampled haplotypes from Brazilian populations, which suggests the occurrence of two invasions in Brazil from Africa, revealing that the scenario of *Z. indianus* introduction in Brazil is far more complex than previously proposed by allo-enzymatic variability analysis and quantitative traits that had suggested a single introduction in Brazil, followed by an extremely fast geographic expansion (Machado et al. 2005; David et al. 2006ab; Galego et al. 2007). COI gene haplotype network suggests that haplotypes sampled in populations localized preferably in the southern part of South America (South of Brazil and Uruguay) were derived from one of the invasions. The other is originated from the same ancestral African population which had previously colonized Asia (1970). This haplotype is directly associated to those sampled from north, southeast, and south Brazilian populations, and to the one sampled in Florida population.

Fig. 1

Haplotypes Network of the ortholog of Est-6 gene from *D. melanogaster*

The analysis of 747 pb fragment gene, ortholog of Est-6 from *D. melanogaster* taken from 19 *Z. indianus* lineages of different geographic regions, has permitted the identification of 12 distinct haplotypes (Figure 1. Online Resource). Median-joining analysis of these sequences has illustrated haplotype sharing amongst recent invader populations (North and South America), while in ancestral ones (Africa) all populations presented distinct haplotypes, though there are evolutionary relations which group them (Fig. 2). These evolutionary relationships have demonstrated to be inconclusive between ancient lineages due to the presence of three homoplasies (Figure 2. Online Resource). In the attempt to solve such problem, polymorphic site, which is responsible for this incongruency, was removed from the analysis generating a new haplotype network (Fig. 2). The new network shows that the haplotype from Alexandria is closer to those from Asian populations; in the haplotype network of the mitochondrial marker it was observed the same (Fig. 1).

Different ancestral nodes link Asian populations (Haifa and Delhi) to South American ones. This indicates that an African colonizing propagule has dispersed in Asia and other in South America. The African origin of *Z. indianus* Brazilian populations corroborates preliminary analysis results of esterase polymorphic loci (Galego et al. 2007), chromosomal inversion polymorphism (Ananina et al. 2007) and quantitative traits (David et al. 2006ab). For the first time it is evidenced in our analysis that in South and North America (Florida) there are individuals sharing the same haplotype, indicating that the species' dispersion to North America had occurred not from African or Asian

populations, but South America population migrants, reinforcing the relations suggested by the COI marker phylogenetic network. The *Z. indianus* dispersion to North America is quite possible, once Brazil is currently the third largest world fruit producer and exports 14 cultures to the USA, featuring grapes, banana, mango, and melon. Interestingly, Florida constitutes North America's financial and commercial activities center, which could explain the introduction of *Z. indianus* from Brazilian populations, first in this North American state. Uruguay, where the extreme distribution of *Z. indianus* in South America occurs, has a very low exportation rate, and it focus on European, Brazilian and Argentinean markets (<http://www.embrapa.br/>; <http://www.mgap.gub.uy>), though it exports fruits like peach, grapes, strawberry, raspberry, mulberry, pear, and apple. It is probable that the colonization process in Asia have occurred through intercontinental fruit transportation during the great navigations in the end of Middle Age and beginning of Modern one (XV century), through spices market and other products between East-West (Galego et al 2007, 2010).

Fig. 2

Considering local and arrival via (introduction type), the recent *Zaprionus* invasion in South America is not still unveiled. However, several hypotheses were proposed for this species' invasion process in America. Vilela (1999), the first researcher to report *Z. indianus* in the American continent, suggested two possible processes for its introduction: the first and least likely one would be that some specimens from this species had escaped from *Drosophilidae* stocks in the *Drosophila* Species resource Center, in Austin, Texas, USA. The second hypothesis is that its introduction has occurred from Africa, through air transportation, directly to São Paulo (Vilela 1999; Tidon et al. 2003). The flies could have been accidentally introduced through planes, as adults or larvae and/or eggs, probably in the meals (fruits, for example) offered to passengers, due to the increasing number of flights from several African and Asian countries to São Paulo city. A third hypothesis would be that the introduction could have occurred through shipping straight at Porto de Santos, considering the importance this port has to the fruit import from Africa (Galego et al. 2007, 2010).

Regardless of how this species was introduced in Brazil, its expansion has progressed in an alarming way; in little more than two years this drosophilid was found in practically all Brazilian states (Castro and Valente 2001; De Toni et al. 2001; Tidon et al. 2003; Loh and Bitner-Mathé 2005). According to Galego et al. (2007) the colonizing propagule which probably came from tropical Africa (Tsacas et al. 1981; David et al. 2006ab; Galego et al. 2007), once in Brazil, had probably dispersed from one local to another, through jumping, due to human transport. It is likely that after its arrival, *Z. indianus* had spread into São Paulo State, mainly through road transport and then to all the country, especially through fruit trading, as initially suggested by Tidon et al. (2003). The main *Z. indianus* dispersion pathways in Brazilian states could have been routes BR116 and BR153, where the first constitutes an important via to trading into Brazilian countryside, and the second on the coastal region, as shown by the Landscape Shape Interpolation analysis performed by Galego et al. (2010).

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

The COI markers polymorphism and the ortholog to Est-6 gene from *D. melanogaster* analysis have made it possible to broaden the knowledge about *Z. indianus* dispersion into the continents. Our data corroborate the African origin of *Z. indianus* (Ananina et al. 2007; David et al. 2006ab; Galego et al. 2007); however, they reveal two introductions in Brazil instead of only one, as previously suggested. The phylogenetic network shows two distinct ancestral haplotypes, directly related to the Brazilian populations' sampled haplotypes, which suggests the occurrence of two invasions from Africa. Two or more introductions are not a surprise, due to the fact that fruit trading is a continuous activity. Our research has evidenced that in South and North America (Florida) individuals sharing haplotypes were found, indicating that the species' dispersion to North America had happened from Brazilian population's migrants, not from Africa or Asian ones. In recent studies regarding *Z. indianus*, including this one, it is clear that biological factors, the species' ecological versatility, associated to factors related to human activity, such as road and air fruit transport, constitute important processes for the geographic expansion of this species.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CNPq (fellowship to LSC) and CMAC. We thank the researchers listed in Table 1 for providing the *Zaprionus indianus* strains.

REFERENCES

- Ananina G, Rhode C, David JR et al. (2007) Inversion polymorphism and a new polytene chromosome map of *Zaprionus indianus* Gupta (1970) (Diptera: Drosophilidae). Genet 131:117–125.
- Amoudi MA, Diab FM, Abou-Fannah SSM (1993) Effects of larval population density on the life cycle parameters in *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera: Drosophilidae). Pakistan J Zool 25:37- 40.
- Castro FL, Valente VLS (2001) *Zaprionus indianus* invading communities in the southern Brazilian city of Porto Alegre. Dros Inf Serv 84:15-17.
- Chassagnard M, Tasacas L (1993) Les sous-genre *Zaprionus* S.STR. Définition de groupes d'espèces et révision du sous-groupe *vittiger* (Diptera: Drosophilidae) Ann Soc Entomol Fr 29:173-194.
- Chassagnard M (1996) Les espèces africaines du sous-genre *Zaprionus* S.STR. à six bandes thoraciques (Diptera: Drosophilidae) Ann Soc Entomol Fr 32:59-65.
- Daniels S B, Strausbaugh LD (1986) The distribution of P-element sequences in *Drosophila*: the *willistoni* and *saltans* species groups. J Mol Evol 23:138-148.

- David JR, Araripe LO, Bitner-Mathe BC, Capy P, Goni B, Klaczo LB, Legout H, Martins MB, Vouldibio J, Yassin A, Moreteau B (2006a) Sexual dimorphism of body size and stenopleural bristle number: a comparison of geographic population of an invasive cosmopolitan drosophilid. *Genet* 128:109-122.
- David JR, Araripe LO, Bitner-Mathe BC, Capy P, Goni B, Klaczo LB, Legout H, Martins MB, Vouldibio J, Yassin A, Moreteau B (2006b) Quantitative trait analyses and geographic variability of natural populations of *Zaprionus indianus*, a recent invader in Brazil. *Hered* 96:53-62.
- De Toni DC, Hofmann PRP, Valente VLS First register of (2001) *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. *Biot* 14:71-85.
- Elias EB (2005) Ecological genetics and cytogenetic studies on two closely-related drosophilids, *Zaprionus indianus* and *Z. tuberculatus*, Dissertation, University of Alexandria, Egypt.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 5:294-299.
- Galego LG, Ceron CR, Carareto CM (2006) Characterization of esterases in a Brazilian population of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). *Genet* 126:89-99.
- Galego LG; Ceron CR, Carareto CM (2007) Analysis of the drosophilid *Zaprionus indianus* introduction in Brazil: contribution of esterase loci polymorphisms. *Dros Inf Serv* 90:79-84.
- Galego LG, Ceron CR, Carareto CM (2010) Scenario for the spreading of the invasive species *Zaprionus indianus* Gupta 1970 (Diptera: Drosophilidae) throughout Brazil. *Genet Mol Biol* 33:767-773.
- Gupta JP (1970) Description of a new species of *Phorticella Zaprionus* (Drosophilidae) from India. *Proc Ind Scienc Acad* 36:62-70.
- Goñi B, Fresia P, Calvino M, Ferreira MJ, Valente VLS, Basso da Silva L (2001) First record of *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera Drosophilidae) in southern localities of Uruguay. *Drosoph Inf Serv* 84:61-65.
- Goñi B, Martinez ME, Techera G, Fresia P (2002) Increased frequencies of *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae) in Uruguay. *Drosoph Inf Serv* 85:75-80.
- Gupta JP, Kumar A (1987) Cytogenetics of *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera: Drosophilidae): nucleolar organizer regions, mitotic and polytene chromosomes and inversion polymorphism. *Genet* 74:19-25.
- Hall TA (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. *Nucl Acid Symp Ser* 41:95-98.
- Karan D, Dubey S, Moreteau B, Parkash R, David JR (2000) Geographical clines for quantitative traits in natural populations of a tropical drosophilid: *Zaprionus indianus*. *Genet* 108:91-100.
- Kato CM, Foureaux LV, César RA, Torres MP (2004) Ocorrência de *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae) no estado de Minas Gerais. *Ciênc Agrotec* 28: 454-455.
- Lachaise D, Tsacas L (1983) Breeding sites in Tropical African drosophilids. In: Ashburner M, Carson HL and Thompson JN (eds) *The Genetics and Biology of Drosophila*, Academic Press, London, pp 221-332.
- Linde K, Steck GJ, Hibbard K, Birdsley JS, Alonso LM, Houle D (2006) First records of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae), a pests species on commercial fruits from Panama and the United States of America. *Florida Entomologist* 89:402-403.
- Loh R, Bitner-Mathe BC (2005) Variability of wing size and shape in three populations of a recent Brazilian invader *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) from different habitats. *Genet* 125:271-281.

- Machado T, Solé-Cava AM, David JR, Bitner-Mathé BC (2005) Allozyme variability in a invasive drosophilid, *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae): comparison of a recently introduced Brazilian population with Old World populations. *Ann Soc Fr* 41:7-13.
- Parkash R, Yadav JP (1993) Geographical clinal variation at seven esterase encoding loci in Indian populations of *Zaprionus indianus*. *Hered* 119:161-173.
- Santos JF, Rieger TT, Campos SRC, Nascimento ACC, Félix PT, Silva SVO, Freitas FMR (2003) Colonization of Northeast Region of Brazil by the drosophilid flies *Drosophila malerkotliana* and *Zaprionus indianus* a new potential insect pest for Brazilian fruitculture. *Drosop Inf Serv* 86:92-95.
- Raga A, Prestes, DAO, Souza Filho MF, Sato ME, Siloto RC, Zucchi RA (2002) Occurrence of fruit flies in coffee varieties in the state of São Paulo, Brazil. *Boletim Sanidad Vegetal y Plagas* 28:519-524.
- Silva NM, Fantinel C, Valente VLS, Valiati VH (2005) Population dynamics of the invasive species *Zaprionus indianus* (Gupta) (Diptera: drosophilidae) in communities of drosophilids of Porto Alegre city, southern of Brazil. *Neotropical Ent* 34:363-374.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680.
- Tidon R, Leite DF, Leão BFD (2003) Impact of the colonization of *Zaprionus* (Diptera, Drosophilidae) in different ecosystems of the Neotropical Region: 2 years after the invasion. *Bioc* 112:299-305.
- Toni DC, Hofmann PRP, Valente VLS (2001) First register of *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae) in the State of Santa Catarina, Brazil. *Biotemas* 14:71-85.
- Tsacas L, Lachaise D, David JR (1981) Composition and biogeography of the Afrotropical drosophilid fauna. In: Ashburner M, Carson HL, Thompson JN (Eds.), *The Genetics and Biology of Drosophila*, vol. 3a. Academic Press, New York, pp 197-259.
- Van der Linde K, Steck GJ, Hibbard K (2006) First records of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae), a pest species on commercial fruits from Panama and the United States of America. *Florida Entomologist* 89:402-404.
- Vilella C R (1999) Is *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophileidae) currently colonizing the Neotropical region? *Dros Inf Serv* 82:37-39
- Vilela CR, Teixeira EP, Stein CP (2001) Mosca-africana-do-figo, *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). In: Vilela EF, Zucchi RA and Cantor F (eds) *Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasi, Holos, Ribeirao Preto (Brazil)*, pp. 48-52.
- Yassin A, Cappy P, Madi-Ravazzi L, Ogereau D, David JR (2009) DNA barcode discovers two cryptic species and two geographical radiations in the invasive drosophilid *Zaprionus indianus*. *Mol.Ecol.Notes* 8:491-501.

Legends of Figures

Fig. 1 Haplotypes network generated by median-joining network analysis of COI marker sequences in 19 *Z. indianus* populations, originated in Africa: Abidjan (AB), São Tomé (ST), Alexandria (ALE); Asia: Haifa (HA), Delhi (DE); Americas: Ceará (CE), Pernambuco (PE), Ilha Bela (IB), Porto Alegre (PA), Florianópolis (FPA), Santa Maria (SM), Uruguay (URUG), São José do Rio Preto (RP), Brasília (BR), Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (BH), Arambaré (AR), Maranhão (MA) and Florida (FL). The size of the circles denotes the number of grouped haplotypes, and the numbers in each branch indicate the number of mutational events.

Fig. 2 Haplotypes network generated by median-joining network analysis of ortholog of esterase 6 gene sequences from *D. melanogaster* in 19 *Z. indianus* populations originated in Africa: Abidjan (AB), São Tomé (ST), Alexandria (ALE); Asia: Haifa (HA), Delhi (DE); Americas: Porto Alegre (PA), Belo Horizonte (BH), Santa Maria (SM), Ceará (CE), Maranhão (MA), Arambaré (AR), Brasília (BR), Florida (FL), Uruguay (URUG), Pernambuco (PE), São José do Rio Preto (RP), Rio de Janeiro (RJ), Ilha Bela (IB), and Florianópolis (FPA). The size of the circles denotes the number of grouped haplotypes and the number in each branch indicates the number of mutational events. In this haplotype network, the polymorphic site which generated the homoplasies was removed from the analysis

Table 1 The geographic localization and collector of *Z. indianus* populations' samples.

	Local	Acronym	Geographic localization	Collector
Ancestors	São Tomé e Príncipe	ST	0°11'08"N/6°36'28"E	David, J ¹
	Abidjan	AB	5°20' 11"N/4°01'36"W	David, J ¹
	Alexandria	ALE	31°13'31"N/29°56'56"E	Stock Center*
Ancient Invaders	Haifa	HA	32°49'56"N/4°58'32"E	David, J ¹
	Delhi	DE	28°36'30"N/77 °13'03"E	David, J ¹
Recent Invaders	Florida	FL	26°47'57"N/81°00'12"W	David, J ¹
	Maranhão (São Luís)	MA	3°33'29,4"S /43°31'22,8"W	Valiati, VH ²
	Barros (CE)	CE	7°10'59"S /38°46'59"W	Franco, F.F ³
	Pernambuco (Itamaracá)	PE	8°3'15,4"S/34°52'54,6" W	Rohde, C ⁴
	Brasília	BR	15°46'S/47°55'W	Tidon, R ⁵
	Belo Horizonte	BH	19°55'S/43°56' W	Galego, LGC ⁶
	São José do Rio Preto (SP)	RP	20°49'S/49°22'W	Galego, LGC ⁶
	Rio de Janeiro	RJ	22°54'S 43°12'W	Bitner-M., B ⁷
	Ilhabela (SP)	IB	23°46'S /45°21'W	Fazza, AC ⁶
	Florianópolis (SC)	FLPA	27°35'S/48°32'W	Hoffman, P ⁸
	Santa Maria (RS)	SM	29°41'S/53°48'W	Valente, V ⁹
	Porto Alegre (RS)	PA	30°01'S/51°13'W	Valente, V ⁹
	Arambaré (RS)	AR	30°52'34,5''S/51°30'22''W	Krelling, J ²
	Uruguai (Rio Negro)	URUG	32°45'27,9"S/57°5'3,1"W	Goñi, B ²

*: **San Diego *Drosophila* Stock Center** (50001.1031-00)

¹: Laboratoire Populations, Génétique et Evolution, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), France.

²: Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, RS, Brazil

³: Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

⁴: Universidade Federal do Pernambuco, UFPE, PE, Brazil

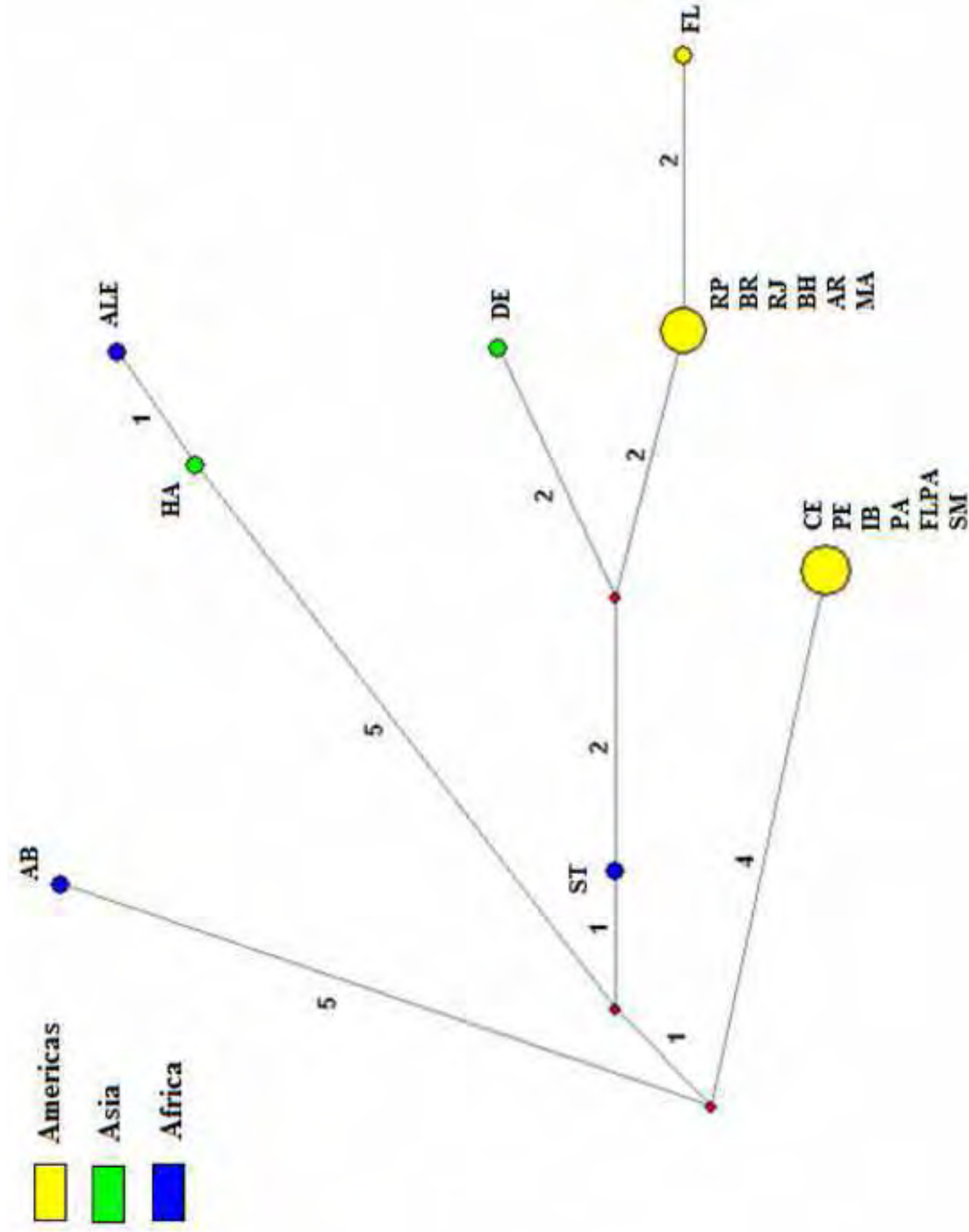
⁵: Universidade de Brasília, DF, Brazil

⁶: Universidade Estadual Paulista, UNESP, SP, Brazil

⁷: Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, RJ, Brazil

⁸: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS, Brazil

⁹: Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Brazil



Supplementary Material

[Click here to download Supplementary Material: EMS.doc](#)

Electronic Supplementary Material (EMS)

The intercontinental dispersion scenario of drosophilid *Zaprionus indianus* revealed by mitochondrial and nuclear markers.

Biological Invasions

Leliane Silva Commar

UNESP – University of São Paulo State, Environmental Sciences and Chemistry Department/ São José do Rio Preto, SP, Brazil
e-mail: commar_ls@yahoo.com.br

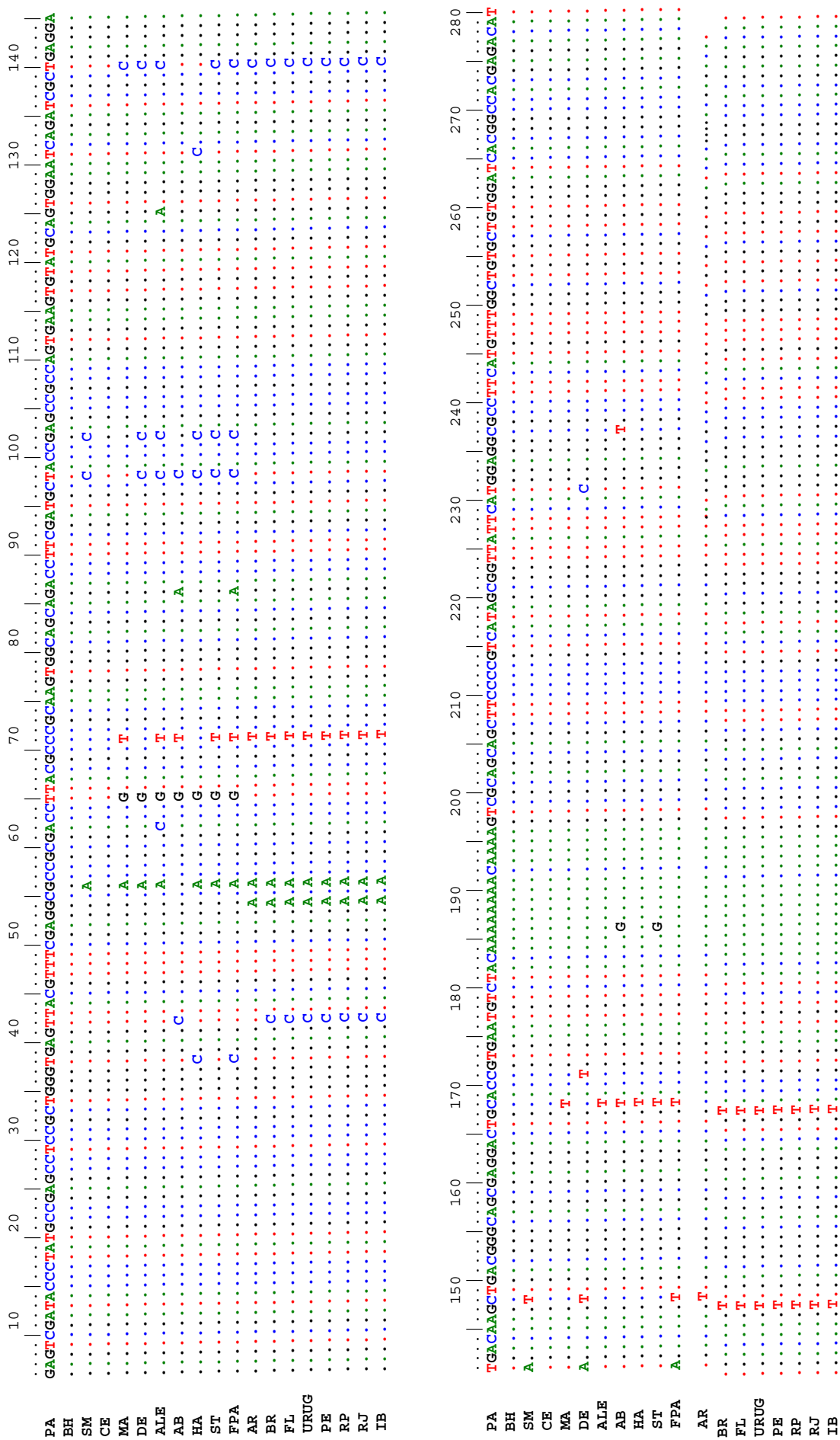
Carlos Roberto Ceron

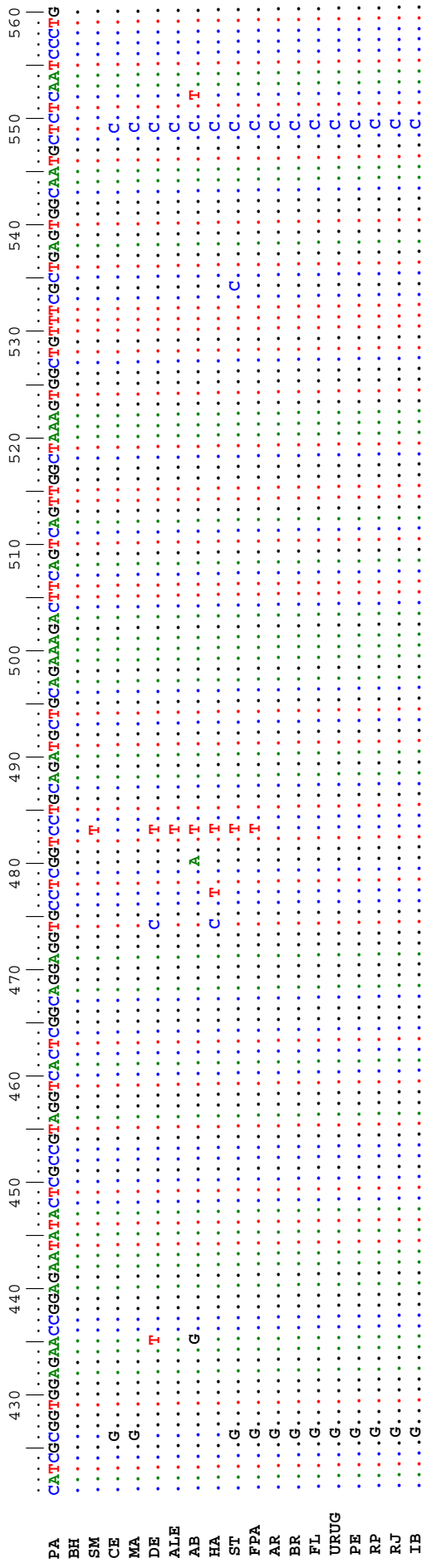
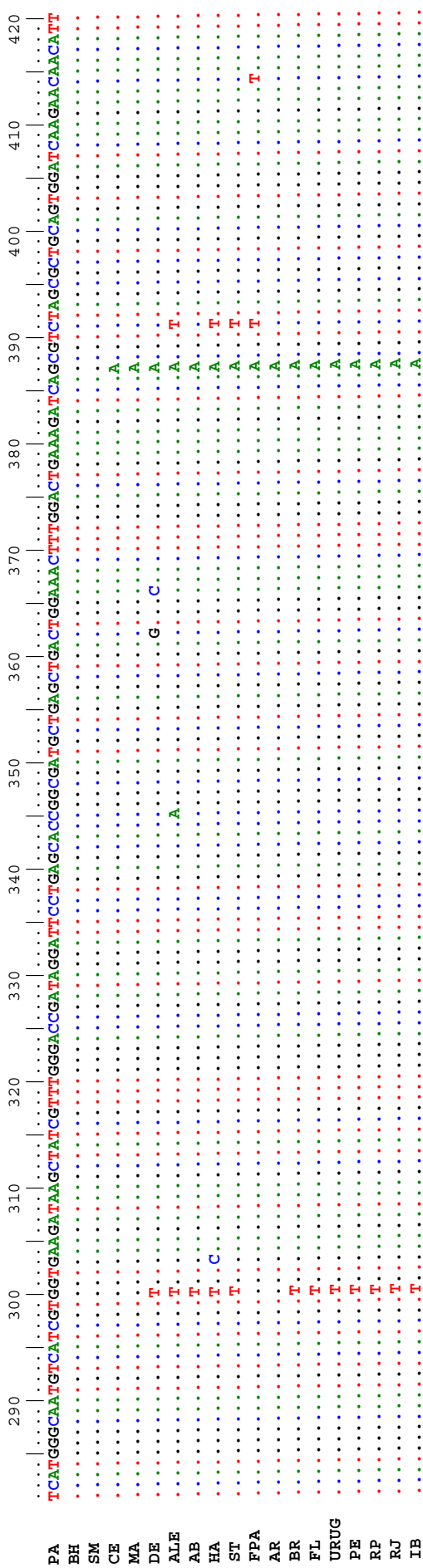
UNESP – University of São Paulo State, Environmental Sciences and Chemistry Department/ São José do Rio Preto, SP, Brazil
e-mail: ceron@ibilce.unesp.br

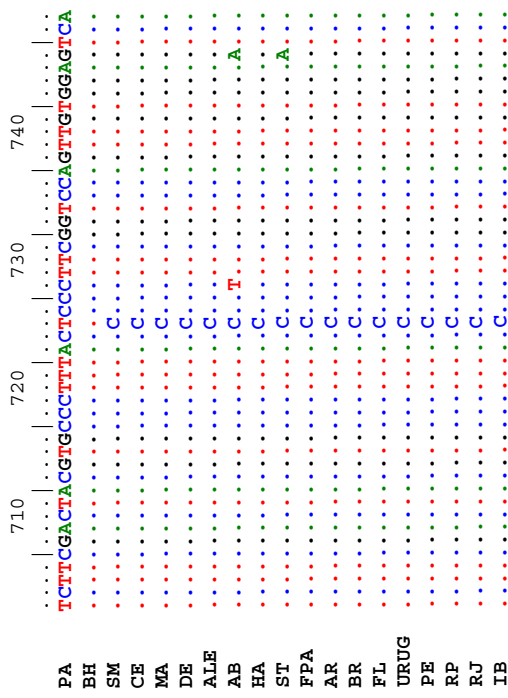
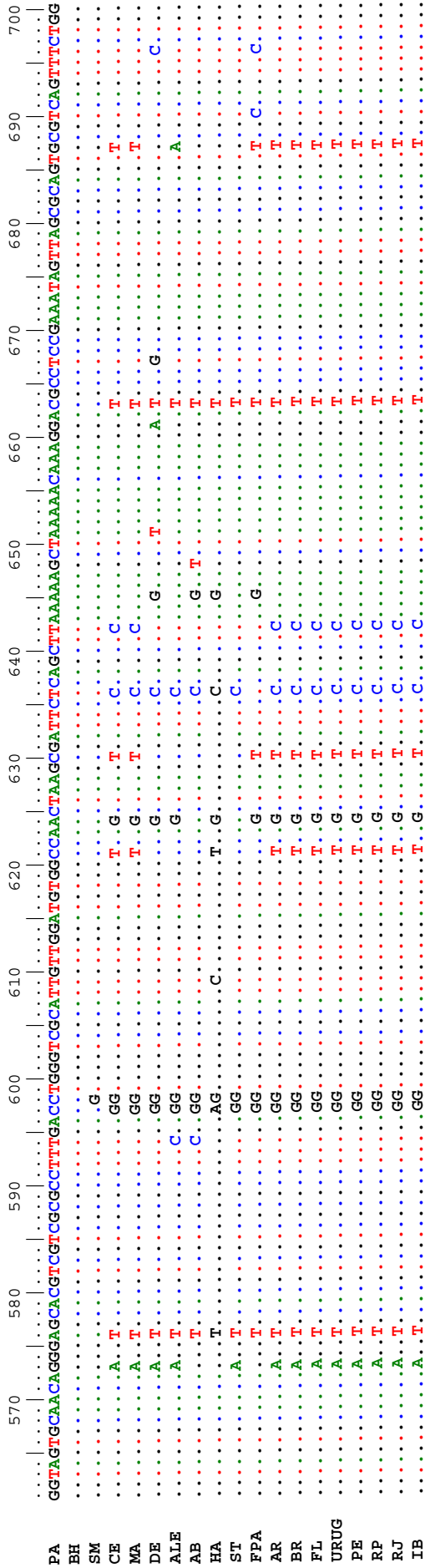
Claudia Marcia Aparecida Carareto2

UNESP – University of São Paulo State, Biology Department/ São José do Rio Preto, SP, Brazil
e-mail: carareto@ibilce.unesp.br
phone: (17) 3221- 2382/ (fax) 3221-2390

Fig 1. DNA polymorphism of 747pb sequences of the ortholog to beta-esterase-6 gene from *D. melanogaster* in 19 populations of *Z. indianus* originated in Africa: Abidjan (AB), São Tomé (ST), Alexandria (ALE); Asia: Haifa (HA), Delhi (DE); Americas: Belo Horizonte (BH), Ceará (CE), Pernambuco (PE), Maranhão (MA), Brasília (BR), São José do Rio Preto (RP), Rio de Janeiro (RJ), Ilha Bela (IB), Porto Alegre (PA), Arambaré (AR), Santa Maria (SM), Florianópolis (FPA), Uruguay (URUG) e Florida (FL).







5. CAPÍTULO III

Análise taxonômica e evolutiva de *Zaprionus indianus* e o sucesso da sua capacidade colonizadora nos diferentes continentes

Leliane Silva Commar¹; Luis Gustavo da Conceição Galego², Carlos Roberto Ceron¹ e Cláudia Márcia Aparecida Carareto³

^{1,3} UNESP – Universidade do Estadual Paulista, ¹Departamento de Química e Ciências Ambientais, ³ Departamento de Biologia - São José do Rio Preto, SP, Brasil; ² UNIP – Universida Paulista - Departamento de Biologia ,SP, Brasil

RESUMO

Zaprionus indianus é um Diptera da família Drosophilidae que expandiu sua distribuição por toda região tropical do planeta, incluindo ainda as de baixas latitudes das regiões Paleártica e Neártica. Várias incongruências taxonômicas e filogenéticas foram observadas em estudos com este drosofilídeo. Atualmente existem propostas de reposicionar o gênero *Zaprionus* para a categoria de subgênero ou grupo do gênero *Drosophila* devido ao fato de que diversas análises, sobretudo com marcadores moleculares, apontarem uma relação estreita com a radiação *immigrans-Hirtodrosophila*, dentro deste gênero. Esses marcadores, além de aloenzimas e traços quantitativos foram também utilizados para descrever o provável cenário das invasões de *Z. indianus* a partir do seu centro de dispersão (África) em regiões da Ásia, que deve ter ocorrido há mais de 30 anos. Estudos dessa natureza também foram conduzidos para se estabelecer a introdução de *Z. indianus* nas Américas. O primeiro relato da introdução desse drosofilídeo no Brasil foi em 1999, sendo atualmente consenso que a introdução teria ocorrido a partir de populações de alta-latidade da África por meio da comercialização de frutos. A introdução no Brasil poderia ter ocorrido por transporte aéreo e/ou marítimo em uma ou mais oportunidades. Há evidências que uma vez no Brasil, este drosofilídeo se dispersou pela região sudeste e, então, para o resto do país por meio do transporte rodoviário. Apesar de atingir *status* de praga durante a introdução, atualmente há evidências que *Z. indianus*, conhecida em nosso país como mosca do figo, não seja mais causadora de prejuízos significativos à agricultura.

Palavras-chave: Drosophilidae, *Zaprionus indianus*; bioinvasões; análises filogenéticas; marcadores moleculares; traços quantitativos; aloenzimas.

Introdução

Há pouco mais de 10 anos, *Zaprionus indianus*, um drosofilídeo pertencente ao gênero *Zaprionus* do subgênero com mesmo nome, foi introduzido no Brasil e aqui se tornou uma importante praga da cultura do figo (VILELA et al., 2000) e uma eficiente competidora contra espécies nativas (SANTOS et al., 2003).

Anatomicamente, *Z. indianus* tem aproximadamente 3,0 mm de comprimento, cor castanha com faixas longitudinais brancas intercaladas com faixas pretas no dorso da cabeça e tórax, além de olhos vermelhos. Vilela et al. (2000) e Stein et al. (2003) fizeram excelentes descrições biológicas sobre *Z. indianus*. Em resumo, a mosca do figo tem como base alimentar bactérias e leveduras encontradas em frutos em decomposição, principalmente *Candida tropicalis*, que parece ser uma levedura importante para a dieta alimentar de *Z. indianus* (GOMES et al., 2003), sendo as substâncias voláteis liberadas durante o processo, o principal atrativo para esse e outros drosofilídeos. Considerando-se os vários locais onde esse organismo foi encontrado, estima-se que *Z. indianus* utiliza cerca de 70 espécies de plantas tanto nativas quanto introduzidas, de 31 famílias diferentes, como fonte de leveduras para a nutrição e para completar seu ciclo de vida. Essa característica generalista talvez seja um dos principais aspectos biológicos que contribuíram para o sucesso da invasão deste drosofilídeo nas regiões tropicais e subtropicais.

Existem muitas especulações sobre a provável origem africana de *Z. indianus* e sobre o modelo de invasão que melhor se ajusta ao processo ocorrido com a mosca do figo. Além disso, continua sendo alvo de diversas discussões taxonômicas e ainda representa uma incógnita quanto a sua real localização filogenética dentro da família Drosophilidae. Esse organismo despertou maior interesse ainda da comunidade científica brasileira em decorrência de sua recente introdução e rápida dispersão inicialmente no Brasil, e posteriormente por grande parte do continente americano. Esses aspectos são abordados nesta revisão, que pretende, além de focar a caracterização taxonômica e filogenética de *Z. indianus*, ainda traçar uma provável rota de dispersão dessa espécie durante sua expansão.

Posicionamento filogenético do gênero *Zaprionus*

Drosophilidae é uma das mais diversas e amplamente distribuídas famílias da ordem Diptera. Consiste de aproximadamente 3.000 espécies, as quais têm sido objeto de estudos ecológicos, genéticos e evolutivos (WHEELER, 1986). *Zaprionus indianus* (GUPTA, 1970) é uma destas espécies, pertencente ao gênero *Zaprionus*. Este gênero é constituído por espécies caracterizadas pela presença de faixas brancas longitudinais na cabeça e no mesonotum e é dividido em dois subgêneros, de acordo com suas origens geográficas, o subgênero *Anaprius* (OKADA, 1990), caracterizado por espécies da região biogeográfica Oriental (OKADA; CARSON, 1983; WYNN; TODA, 1988; GUPTA; GUPTA, 1991), que inclui 10 espécies, e o subgênero *Zaprionus*, constituído por 49 espécies essencialmente afrotropicais (OKADA; CARSON, 1983; YASSIN et al., 2008ab). Segundo Chassagnard (1996), *Z. indianus* está incluída no grupo *armatus* (30 espécies) e subgrupo *vittiger* (13 espécies).

Gupta (1970) propôs o epíteto *indianus* à espécie provavelmente devido ao exemplar tipo utilizado na identificação ser proveniente da Índia e seu provável desconhecimento da ocorrência da espécie em toda a região afrotropical (VILELA et al., 2000). Este não foi, porém, o único equívoco relacionado à identificação desta espécie. Tsacas (1985) fez uma revisão de todos os problemas relacionados à nomenclatura de *Z. indianus*. Neste trabalho, a autora apontou como sinónimas as espécies *Z. inermis* (SÉGUY, 1983), *Z. paravittiger* (GOODBOLE; VAIDYA, 1972) e *Z. collari* (TSACAS, 1980), além da identificação incorreta da espécie *Z. vittiger* (COQUILLET, 1901), com a qual *Z. indianus* pode ser facilmente confundida.

Além das suas incongruências taxonômicas, o gênero *Zaprionus* originou várias discussões acerca de sua real posição filogenética dentro da família Drosophilidae. As relações filogenéticas dos drosofilídeos têm sido analisadas em diversos estudos, inicialmente usando marcadores morfológicos (THROCKMORTON, 1962, 1975; GRIMALDI, 1990) e, mais recentemente, marcadores moleculares (DE SALLE, 1992; PELANDAKIS et al., 1991; PELANDAKIS; SOLIGNAC, 1991, 1993; THOMAS; HUNT, 1993; KWIATOWSKI et al., 1994, 1999; POWELL, 1997; REMSEN; DE SALLE, 1998; RUSSO et al., 1995; TATARENKOV et al., 1999; ROBE et al., 2005; DA LAGE et al., 2007). Incongruência entre estudos baseados no sequenciamento do DNA e

na morfologia é uma ocorrência comum em estudos filogenéticos de muitos organismos, incluindo os Drosophilidae (GRIMALDI, 1991; KWIATOWSKI; AYALA, 1999; DURANDO et al., 2000; REMSEN; O'GRADY, 2002). A concatenação de dados morfológicos e moleculares, que é uma possível solução para resolver incongruências filogenéticas, não tem solucionado esse problema. Wortley e Scotland (2006), por exemplo, analisaram o efeito dessas concatenações e concluíram que a morfologia geralmente não aumenta a precisão dos dados filogenéticos.

A primeira tentativa de se estabelecer as possíveis relações filogenéticas dentro da família Drosophilidae foi realizada por Throckmorton (1962, 1975), que utilizou dados biogeográficos, anatômicos e comportamentais. Em sua proposta, Throckmorton (1975) caracterizou a família Drosophilidae como um grupo parafilético e considerou *Zaprionus* um subgênero do gênero *Drosophila*, dentro da radiação *immigrans-Hirtodrosophila*. Críticas foram feitas à classificação de Throckmorton e outras análises propuseram novas relações entre os grupos de espécies de Drosophilidae. Grimaldi (1990), por exemplo, usando análise cladística, construiu uma árvore filogenética para espécies de *Drosophila* e seus gêneros relacionados, com aporte de 217 caracteres morfológicos de 120 espécies representativas. Nesta filogenia, os subgêneros *Hirtodrosophila*, *Scapytomiza*, *Idiomyza* e *Zaprionus* foram excluídos do gênero *Drosophila*. Apesar das análises de DNA mitocondrial de De Salle (1992) corroborarem a topologia proposta por Grimaldi (1990) e posicionarem *Zaprionus* entre o gênero *Scaptodrosophila* e o subgênero mais basal do gênero *Drosophila* – o subgênero *Sophophora*, a maioria das análises utilizando marcadores moleculares, realizadas posteriormente, apresentam resultados conflitantes com as propostas de Grimaldi (1990) e De Salle (1992).

Um dos principais estudos moleculares dentre os acima citados foi o de Pelandakis e Solignac (1993) que coloca *Z. indianus* dentro do gênero *Drosophila*. Os autores analisaram sequências de RNA ribossômico, em 72 espécies de Drosophilidae e posicionaram quatro espécies do subgênero *Zaprionus* (*Z. inermis*, *Z. sepsoides*, *Z. capensis* e *Z. taronus*) e uma do subgênero *Anaprionus* (*Z. lineosus*) em um clado único, dentro do subgênero *Drosophila*, intimamente relacionado com os grupos *immigrans* e *repleta*. Thomas e Hunt (1993) também contestaram as propostas de Grimaldi (1990) e De Salle (1992) em sua análise com 11 sequências do gene da enzima álcool

desidrogenase (*Adh*) de diferentes gêneros de drosofilídeos. Nessa análise *Zaprionus* foi incluído no gênero *Drosophila*, mas em um ramo entre os subgêneros *Drosophila* e *Sophophora*. Relação filogenética similar foi obtida por Kwiatowski et al. (1994) e Russo et al. (1995). No primeiro trabalho, no qual foram utilizadas sequências do gene Cobre/Zinco superóxido desmutase (*Cu/Zn Sod*), o gênero *Zaprionus* ficou posicionado como grupo externo do clado de *virilis/repleta* (subgênero *Drosophila*). No segundo, analisaram-se sequências de *Adh* disponíveis na literatura e *Zaprionus* foi posicionado como grupo externo do subgênero *Drosophila*, mas próximo de *D. immigrans*.

Outras análises filogenéticas também posicionaram *Zaprionus* próximo à *D. immigrans*, mas como grupo externo ao clado desse grupo de espécies de *Drosophila*. É o caso dos trabalhos de Powell e De Salle (1995), com sequências de DNA mitocondrial e DNA ribossomal, além de dados morfológicos e comportamentais, e de Remsen e De Salle (1998), que analisaram, além dos dados utilizados por Powell e De Salle (1995), sequências de nucleotídeos dos genes *Adh* e *Sod*.

Por outro lado, a análise filogenética de Tatarenkov et al. (1999), utilizando quatro marcadores nucleares (*Ddc*, *Sod*, *Adh* e *Gpdh*) colocou *Zaprionus* e *Scaptomyza* no subgênero *Drosophila*, topologia esta também proposta por Throckmorton (1962, 1975) e refutada por Grimaldi (1990), que excluiu esses dois grupos do gênero *Drosophila*. As análises de Tatarenkov et al. (1999) sugerem ainda que *Zaprionus* e *Scaptomyza* formariam um clado irmão com os grupos *virilis* e *repleta*. A partir desses resultados, Tatarenkov et al. (1999) propuseram que as espécies de *Zaprionus* deveria ser considerado um subgênero do gênero *Drosophila*.

Kwiatowski e Ayala (1999), utilizando sequências dos genes *Adh*, *Sod* e *Gpdh*, posicionaram filogeneticamente *Zaprionus* dentro do gênero *Drosophila*, participando do mesmo clado que *D. immigrans*. Estudo de Robe et al. (2005), analisando os genes nuclear alfa metil-dopa (*Amd*) e mitocondrial citocromo oxidase II (*COII*), e de Da Lage et al. (2007), com sequências do gene *Amyrel*, reforçam a inclusão de *Zaprionus* na radiação *immigrans-Hirtodrosophila* do subgênero *Drosophila*. Em um estudo utilizando o gene *Amyrel*, adicionando à análise o gene *COII*, e caracteres morfológicos, propôs-se que *Zaprionus* seria mais intimamente relacionado com *Drosophila repletoides*, do grupo

tumiditarsus, que é classificado basalmente no subgênero *Drosophila* (YASSIN et al., 2008a).

Estudos recentes, focando apenas a espécie *Z. indianus*, permitiram inferir relações filogenéticas com espécies de *Drosophila* pela análise de sequências de uma α -esterase em espécies de *Drosophila* (DE SETTA et al., 2008). Os resultados corroboraram propostas anteriores de Trockmorton (1962, 1975) os quais inserem *Z. indianus* no gênero *Drosophila*, no entanto, mais relacionada com espécies do subgênero *Sophophora*. Commar et al. (2011, tese) analisando diversas sequências de esterases ortólogas à EST-6 de *D. melanogaster* mostrou que essas esterases apresentam similaridade média nucleotídica de 68% comparável com a encontrada para outros genes considerados ortólogos ao gene *Est-6* de *D. melanogaster*, como o de *D. virilis*, 67% (SERGEEV et al., 1995) e *D. pseudoobscura*, 73% (BRADY et al., 1990). A filogenia reconstruída a partir deste gene nuclear também incluiu *Z. indianus* na família Drosophilidae, no subgênero *Drosophila* (TROCKMORTON, 1962, 1975; PELANDAKIS; SOLIGNAC, 1993; KWIATOWSKI et al., 1994; KWIATOWSKI; AYALA, 1999), neste caso, como um clado mais próximo das espécies do grupo *repleta*.

Apesar da topologia proposta por Grimaldi (1990), baseada em dados morfológicos, e De Salle (1992), baseada em dados moleculares, sugerirem a inclusão de *Zaprionus* como um gênero da família Drosophilidae, sequências nucleotídicas de diversos genes, muito similares às de espécies da radiação *immigrans-Hirtodrosophila*, agrupam as espécies de *Zaprionus* no subgênero *Drosophila*. (THROCKMORTON, 1975; GRIMALDI, 1990; DE SALLE, 1992; POWELL; DE SALLE, 1995; REMSEN; DE SALLE, 1998; KWIATOWSKI; AYALA, 1999). Esses resultados justificariam uma nova classificação para o gênero *Zaprionus*, colocando-o como um subgênero dentro do gênero *Drosophila*, ou mesmo, um grupo dentro do subgênero *Drosophila*.

As dúvidas sobre o posicionamento filogenético de drosofilídeos, fora ou dentro do gênero *Drosophila*, não se restringem ao gênero *Zaprionus*. A reconstrução filogenética, realizada por Van der Linde e Houle (2008), combinando dados de 117 árvores, permitiu gerar uma “*supertree*” (Figura 1) que corrobora a parafilia do gênero *Drosophila*, também agrupa *Zaprionus* com espécies da radiação *immigrans-tripunctata*, o agrupamento atualmente mais aceito.

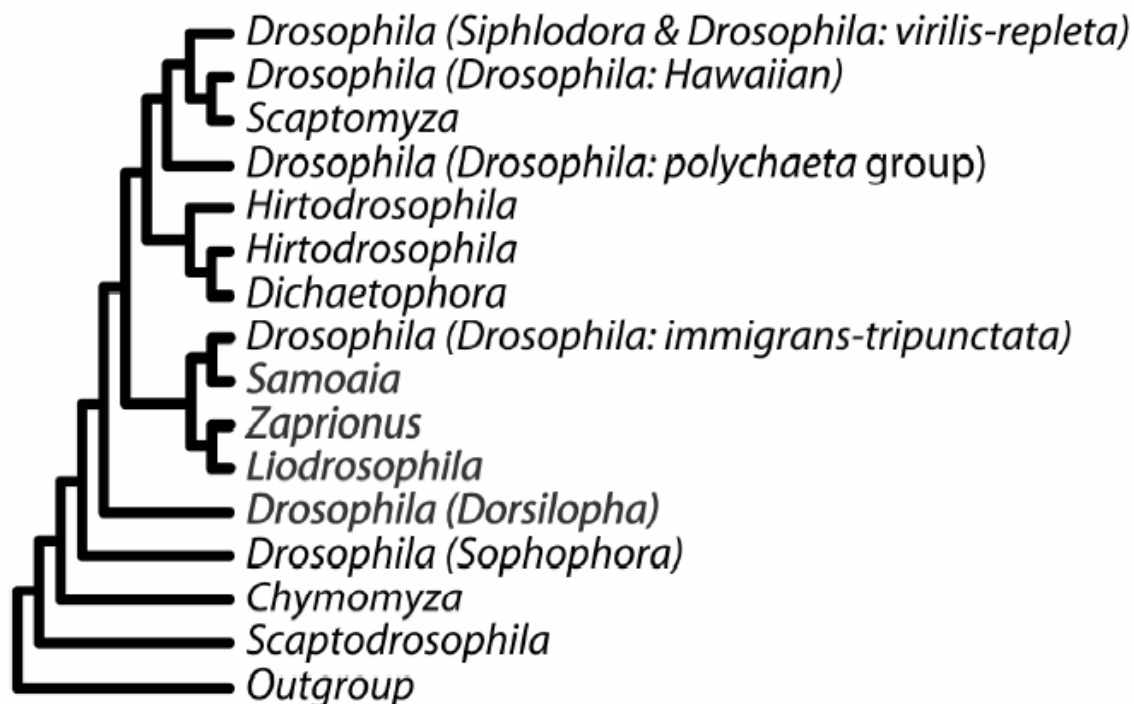


Figura 1. Filogenia “supertree”: Resumo dos gêneros, subgêneros do gênero *Drosophila*, e um clado maior dentro do subgênero *Drosophila* (VAN DER LINDE; HOULE, 2008).

Para uma maior compreensão da história evolutiva do gênero *Zaprionus* são necessárias outras análises utilizando um número maior de marcadores moleculares e caracteres morfológicos. No entanto, a maioria dos estudos indica que a diversificação de *Zaprionus* aconteceu após a origem do subgênero *Sophophora*, tornando-o mais relacionado ao subgênero *Drosophila*. Contudo, a relação filogenética exata entre *Zaprionus*, bem como de outros drosofilídeos, e o gênero *Drosophila* ainda é motivo de especulações.

Evolução e distribuição geográfica do gênero *Zaprionus*

Postula-se, atualmente, que o gênero *Zaprionus* tenha origem mais recente, na região Oriental, durante o período médio do Mioceno (10 milhões de anos atrás), em comparação com a origem do subgênero *Drosophila* (60 milhões de anos atrás). A colonização da África por esse drosofilídeo, é datada, por volta de 7 milhões de anos

atrás, durante o Mioceno tardio, por meio de uma rota marítima das Ilhas do Oceano Índico. Isto está em concordância com evidências paleogeográficas, que indicam que a África não estava em contato direto com outros continentes até o Mioceno, quando uma ligação definitiva foi formada com a Eurásia (GHEERBRANT; RAGE, 2006). Entretanto, a maior parte da diversificação morfológica e ecológica ocorreu mais tarde, na África Ocidental, durante as mudanças climáticas cíclicas do Quaternário. Além disso, algumas espécies tornaram-se invasoras recentes, como *Z. indianus*, que invadiu com êxito América Sul e do Norte, durante a última década. Os estudos sobre a origem e as relações filogenéticas das espécies do gênero *Zaprionus* indicam que sua diversificação aconteceu contemporaneamente com a evolução das espécies do subgrupo *melanogaster* de *Drosophila* (YASSIN et al., 2008a).

Dois cenários são propostos para a dispersão do gênero *Zaprionus* a partir de sua origem. Uma rota de dispersão por meio do Oriente Médio, seguindo-se uma radiação adaptativa africana de *Zaprionus*, especialmente após a formação do Grande Vale do Rift e o Mar Vermelho no período tardio do Mioceno, agindo como uma barreira geográfica (YASSIN et al., 2009a). Por outro lado, uma outra hipótese para a dispersão do gênero, seria através de uma rota Indo-Malasia, que está de acordo com a origem das fortes chuvas sazonais em Madagascar, devido ao início da formação das monções indianas (8 milhões de anos atrás; YODER; NOWAK, 2006), pois um clima úmido é ideal para drofilídeos tropicais. Recentemente, três espécies Afrotropicais distantemente relacionadas (*Z. indianus*, *Z. tuberculatus* e *Z. ghesquierei*) adquiriram capacidade invasiva e foram coletadas na região Paleártica (CHASSAGNARD; KRAAIJEVELD, 1991). *Z. indianus* é a espécie mais difundida do gênero, largamente encontrada em três continentes: Ásia, África e Américas.

Compartilhamento de aspectos ecológicos, etológicos e evolutivos entre *Zaprionus* e *Drosophila* e invasão genômica por elementos de transposição

A similaridade entre as características evolutivas e a riqueza e a diversidade ecológica do gênero *Zaprionus* e de espécies do subgrupo *melanogaster* têm sido

destacadas em estudos evolutivos envolvendo a família Drosophilidae (DE SETTA et al., 2011).

Como já mencionado, a origem do gênero *Zaprionus*, remonta aos períodos médio e tardio do Mioceno (há cerca de 10 milhões de anos), na região oriental, e posterior diversificação na África Tropical (YASSIN et al. 2008a). Curiosamente, a origem evolutiva do subgrupo *melanogaster* ocorreu no mesmo período e região geográfica (LACHAISE, 2004). Esta sobreposição de tempo e lugar de origem e diversificação permite uma série de estudos evolutivos por meio de comparações de dados genéticos, morfológicos e comportamentais. Vários desses estudos envolveram a análise de sequências de elementos transponíveis (como *mariner*, *copia*, *gypsy* e *micropia*) em espécies dos dois grupos (MARUYAMA; HARTL 1991; BRUNET et al., 1999; HEREDIA et al., 2004; DE ALMEIDA; CARARETO 2006; DE SETTA et al., 2009; VIDAL et al., 2009, DEPRÁ et al., 2010; DE SETTA et al., 2011) e apontaram incongruências entre a filogenia das espécies do grupo *melanogaster* e *Zaprionus*, baseada nos elementos transponíveis, decorrentes de maior similaridade entre sequências dos elementos transponíveis de espécies de *Zaprionus* com as dos elementos de espécies do subgrupo *melanogaster*, do que entre elementos dos mesmos grupos de espécies. Adicionalmente, esses elementos não ocorrem em outras espécies do grupo *melanogaster*.

Essa similaridade poderia meramente refletir uma classificação filogenética incorreta de *Zaprionus*. Por outro lado, se *Zaprionus* não está realmente relacionada com espécies do grupo *melanogaster*, como as análises filogenéticas atuais têm sugerido, duas outras hipóteses poderiam ser levantadas. Uma delas seria que a presença desses elementos em espécies do gênero *Zaprionus* e sua ausência em outras espécies do grupo *melanogaster* poderia ter decorrido de uma perda estocástica nas outras espécies; outra hipótese seria a ocorrência do fenômeno da transferência horizontal. Os estudos acima citados indicam que esses elementos estão envolvidos em eventos de transferência horizontal entre espécies do gênero *Zaprionus* e do subgrupo *melanogaster* do gênero *Drosophila*.

A coexistência geográfica entre as espécies do grupo *melanogaster* e do gênero *Zaprionus*, que parecem compartilhar a mesma época de origem e diversificação na

África Tropical, bem como o compartilhamento de características ecológicas, sugerem que ambos os grupos de espécies passaram por um período permissivo de invasão de elementos transponíveis durante sua diversificação. Adicionalmente, em virtude do potencial invasivo de diversas espécies de ambos os grupos, como *D. melanogaster* (DAVID; CAPY, 1988), *D. simulans* (HAMBLIN; VEUILLE, 1999), *D. malerkotliana* (VOGL et al., 2003), *D. ananassae* (VAL; SENE, 1980) e *Zaprionus indianus* (GUPTA, 1970), poderiam potencializar eventos de transferência horizontal conforme sugerido pela última hipótese apresentada.

O processo de colonização intercontinental de *Zaprionus indianus*

Existem muitos estudos sobre a provável origem de *Z. indianus*. Por ser considerada uma das mais bem sucedidas espécies colonizadoras do gênero, devido à sua rápida expansão geográfica, muitas hipóteses em relação ao seu processo invasivo já foram propostas. Atualmente, tem sido difícil controlar sua propagação, visto que esta espécie tem encontrado condições favoráveis para sua multiplicação e posterior dispersão pelos continentes. A invasão recente na América do Sul tem sido alvo de várias discussões. Este acúmulo de informações sobre essa espécie gerou uma série de especulações que tem resultado em diversas hipóteses do provável cenário das duas grandes invasões (Velho Mundo, Ásia, e Novo Mundo, América).

A colonização da Ásia

Atualmente, é quase consenso que *Z. indianus* tenha se originado na África (TSACAS; LACHAISE, DAVID, 1981; TSACAS, 1985; DAVI et al., 2006ab), sendo que a colonização da Ásia pode ter ocorrido há mais de 30 anos (DAVID et al., 2006a) considerando-se a descrição feita por Gupta (1970) com espécimes-tipo oriundos da Índia, ou mesmo há séculos (KARAN et al., 2000).

O processo de colonização da Ásia não foi bem documentado e alguns autores chegaram mesmo a afirmar que a espécie era endêmica da Índia (GUPTA, 1970) e Paquistão (SHAKOORI; BUTT, 1979). Contudo, apesar de sua proximidade com a Índia, surpreendentemente, essa espécie não foi registrada no Sri Lanka (KARAN et al., 2000).

Posteriormente, *Z. indianus* foi encontrada nas Ilhas Camores, Canárias e Madagascar (CHASSAGNARD; TSACAS, 1993), como também na Arábia Saudita (AMOUDI et al., 1991; 1993ab) e em outras partes da região Paleártica (CHASSAGNARD; KRAAIJEVELD, 1991).

Os poucos registros de *Z. indianus* na Ásia, compreendem principalmente estudos envolvendo polimorfismos aloenzimáticos e traços quantitativos. Por exemplo, Karan et al. (1999), a partir de linhagens isofêneas do sul da Índia, estimaram a norma de reação para cinco traços morfométricos conforme o aumento de temperatura, além de comparar esses traços em machos e fêmeas. Os autores mostraram que ao menos três traços (tamanho do corpo, tórax e asas) apresentaram redução estatisticamente significativa conforme o aumento da temperatura. Esses dados estão de acordo com a hipótese de que a plasticidade fenotípica em organismos ectotérmicos se expressa com a redução no tamanho de traços quantitativos em resposta ao aumento de temperatura ambiental (ATKINSON; SIBLY, 1997; JAMES et al., 1997).

Outro estudo relacionado a traços quantitativos em populações asiáticas de *Z. indianus*, sobretudo indianas, indicou a ocorrência de variações clinais na distribuição destas características ao longo do continente indiano (KARAN et al., 2000). Os autores desse estudo detectaram aumento estatisticamente significativo em vários traços quantitativos (peso, tamanho da asa, tamanho do corpo) e reprodutivos (número de ovários) conforme o aumento na latitude, além de aumento significativo nas medidas de traços quantitativos (tamanho do corpo, asas e tórax) conforme o aumento da altitude. Ambas as características geográficas (latitude e longitude) não são por si só fatores seletivos, mas podem estar relacionadas a alguma forma de seleção climática (KARAN et al., 2000). Uma explicação consenso é que tanto latitudes quanto altitudes maiores apresentam níveis de temperatura ambientais mais baixos do que as menores. Dessa forma, esses dados indicam uma evidência indireta de atuação da seleção natural, provavelmente promovida pela variação de temperatura. Ainda é discutido de que maneira um corpo maior é mais adaptativo em temperaturas mais baixas, mas vários autores (STALKER, 1980; DAVID et al., 1994; PÉTAVY et al., 1997; AZEVEDO et al., 1998) sugerem uma melhoria na capacidade de voo com o aumento do corpo.

Ao contrário do que acontece com traços quantitativos, clinas relacionadas a polimorfismos aloenzimáticos são consensualmente atribuídas à maior ou menor estabilidade das variantes de acordo com a temperatura (WILLS, 1981; HEDRICK, 1983; PARKASH; SHARMA, 1993; PARKASH; YADAV, 1993a). Assim, variantes termorresistentes possibilitariam uma vantagem em ambientes com temperatura ambiental maior (baixas latitudes e altitudes) e as termo suscetíveis em ambientes com temperaturas menores (altas latitudes e altitudes). Ambientes com variação significativa de temperatura ao longo do ano poderiam apresentar populações com variantes de ambos os tipos, ou heterozigose observada superior à esperada, fruto de seleção balanceada (PARKASH; SHARMA, 1993; PARKASH; YADAV, 1993a).

Vários estudos com diferentes marcadores aloenzimáticos em populações indianas de *Z. indianus* indicaram a ocorrência de variação clinal. Parkash e Shamina (1993) mostraram diferenças estatisticamente significantes em polimorfismos de aloenzimas (ACPH, esterases e MDH) entre a heterozigose observada e esperada em amostragens anuais (Janeiro de 1988 e de 1990) em uma população de *Z. indianus* de Dehradun, indicando uma prevalência de heterozigotos nessa população. Parkash e Sharma (1993) e Parkash e Yadav (1993a) detectaram um padrão clinal de distribuição de polimorfismos esterásicos em diferentes populações indianas conforme a latitude. Parkash e Yadav (1993b), Yadav e Parkash (1993a) e Parkash et al. (1994) também relataram uma distribuição clinal significativa para a distribuição de variantes eletromorfas de aloenzimas (Acph-1^S, Acph-1^F, Mdh-1^F, Ao^S, Adh^F, Est-1 e 2 e α -Gpdh^F), bem como, Parkash, Yadav e Shamina (1992) encontraram um aumento significativo das frequências do alelo Adh^F conforme o aumento de latitude. Ainda sobre a variante Adh^F, Yadav e Parkash (1993b) encontraram fortes evidências de que esta variante aumenta a tolerância a concentrações mais altas de etanol em indivíduos de *Z. indianus* portadores dela.

A variação clinal, acima destacada, encontrada em algumas populações de *Z. indianus*, da Ásia, é indicativa de uma colonização antiga. Os detalhes desta colonização foram completamente perdidos, mas devido à associação deste drosofilídeo com ambientes alterados e evidências da recente colonização da América ter provavelmente ocorrido por meio do transporte intercontinental de frutos (DAVID et al., 2006b; YASIN

et al., 2009; GALEGO; CARARETO, 2010), é provável que o processo de colonização na Ásia tenha ocorrido de maneira similar, durante as grandes navegações do final da Idade Média ou início da Moderna (séc. XV), pelo comércio de especiarias e outros produtos entre oriente-ocidente (GALEGO, CARARETO 2007; GALEGO, CARARETO, 2010). No entanto, restam ainda questionamentos a respeito da dispersão de *Z. indianus* nas regiões Paleárticas, por meio do comércio internacional de frutas. Por exemplo, enquanto na América a dispersão dessa espécie foi extremamente rápida (aproximadamente 6 anos, de São Paulo à Flórida), o processo de dispersão levou mais de 40 anos da Índia para o Egito. Uma possível explicação para essa rápida propagação entre as Américas pode estar relacionada ao grande desenvolvimento de seu comércio de frutas por via rodoviária (GALEGO; CARARETO, 2010).

De acordo com Yassin et al. (2009a), a população do Egito parece ter origem realmente recente, posterior a dezembro de 2002. Acredita-se que muitos dos drosofilídeos migraram de regiões vizinhas da África, Ásia e Europa. A introdução de *Z. indianus* pode ter sido resultado de uma expansão natural do norte da África, por meio do Vale do Nilo, ou então por meio do comércio de frutas da África oriental ou Ásia. Análises de polimorfismos de inversões cromossômicas demonstraram que as populações de Alexandria (Egito) estão mais relacionadas com populações indianas (GUPTA; KUMAR, 1987), do que em relação às populações africanas (ELIAS, 2005) e brasileiras (ANANINA et al., 2007). Análises quantitativas, de aloenzimas e RAPD demonstraram baixa variabilidade genética em populações de *Z. indianus* (YASSIN et al., 2005; YASSIN et al., 2009b), o que caracteriza populações que foram introduzidas recentemente, como relatado para as populações de *Z. indianus* no Egito.

Colonização da América

Vilela (1999) foi o primeiro pesquisador a relatar a presença de *Z. indianus* no continente americano. Ele observou a espécie em caquis (*Diospyros kaki*, Ebenaceae) oriundos de Santa Isabel, região metropolitana de São Paulo. No mesmo período, outros pesquisadores também coletaram a espécie em outras localidades de São Paulo e do Distrito Federal e comunicaram esses registros a Vilela et al. (2000), tais como os realizados por: E.P. Teixeira, em Valinhos (SP); F.M. Sene, em Ribeirão Preto (SP);

H.E.M.C. Bicudo e L. Madi-Ravazzi, em São José do Rio Preto (SP); e R. Tidon-Sklorz, no Distrito Federal. Ainda em 1999, *Z. indianus* foi coletada praticamente em todas as regiões do estado de São Paulo, principalmente por pesquisadores do Instituto Agrônomo de Campinas e pelo próprio Vilela (VILELA et al., 2000).

Vilela et al. (2000) sugeriram dois possíveis processos para a chegada de *Z. indianus*: o primeiro e menos provável seria que alguns espécimes tivessem escapado dos estoques de drosofilídeos do *Drosophila* Species Resource Center, em Austin, Texas, Estados Unidos. A segunda hipótese proposta por Vilela et al. (1999) é a de que a introdução tenha ocorrido a partir da África por meio de transporte aéreo, diretamente em São Paulo. Uma terceira hipótese, proposta por Galego e Carareto (2007), analisando polimorfismo esterásico, seria que a introdução poderia ter ocorrido por meio de transporte marítimo diretamente no Porto de Santos, considerando a importância deste local para as importações que chegam ao Brasil (um quarto de todos os produtos comercializados pelo país no mercado internacional). Esses autores sugerem ainda que após a chegada de *Z. indianus* no Brasil, esta espécie se espalhou pelo o Estado de São Paulo principalmente por transporte rodoviário e em seguida por todo o país, principalmente como resultado do comércio de frutas, como sugerido inicialmente por Tidon et al. (2003). As principais vias de dispersão de *Z. indianus* pelos estados brasileiros, poderiam ter sido as rodovias BR153 e BR116, já que a primeira é uma via importante para o intercâmbio comercial no interior do Brasil e a última nas regiões costeiras (GALEGO E CARARETO, 2010), como sugerido por meio de suas análises de Landscape Shape Interpolation.

Segundo a Organização da Agricultura e Alimentação (Food and Agriculture Organization, FAO, 1997), o mercado global de frutas cresceu cerca de 13% no período de 1985-1995. Segundo França e Gondin (1999), a comercialização de frutas, devido ao volume e às necessidades especiais de conservação, é feita principalmente por transporte marítimo. O Brasil importa principalmente, segundo dados do Instituto Brasileiro de Frutas (IBRAF, 2000-2001, disponível em <http://www.ibraf.org.br/x-es/pdf/t-esta_cijd.pdf>, acesso em 29/04/2007), pêra, maçã, ameixa, kiwi, uva, cereja, nectarina e pêssego. As importações brasileiras apresentaram um crescimento significativo entre as décadas de 70 a 90, inclusive com o continente africano. Atualmente, o Brasil mantém

acordos bilaterais de comércio com a maioria dos países da África (Disponível em <http://www.mre.gov.br/index.php?option=com_content&task=category§ionid=5&id=11&Itemid=557>, acesso em 29/04/2007), com destaque para a África do Sul, do qual importa minérios e produtos agrícolas, dentre os quais uvas (Disponível em <<http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/secex/bartecnicas/barnaotarifadas/africasul.pdf>>, acesso em 29/04/2007).

É possível que a introdução de *Z. indianus* no Brasil tenha ocorrido a partir de alimentos contaminados, seja daqueles utilizados nas refeições dos marinheiros, seja por frutas comercializadas que apresentavam contaminação (VILELA et al., 2000). A segunda hipótese é a mais provável, pois dados oriundos de diferentes marcadores (morfológicos, ecológicos e genéticos) indicam que o propágulo fundador foi bastante numeroso (GALEGO; CARARETO, 2007; ANANINA et al., 2007).

Independente da forma de introdução, a expansão de *Z. indianus* progrediu de maneira galopante; em pouco mais de dois anos, este drosofilídeo já era encontrado praticamente em todos os estados brasileiros. Ainda em 1999 ele foi detectado em Santa Catarina (DE TONI et al., 2001) e outras áreas do cerrado brasileiro e do Centro-Oeste (TIDON, 2003). Em 2000, *Z. indianus* chegou ao Rio Grande do Sul (CASTRO; VALENTE, 2001), no Rio de Janeiro (LOH; BITNER-MATHÉ, 2005) e no Uruguai (GOÑI et al., 2001, 2002). Em 2001, Kato et al. (2004) registraram pela primeira vez este drosofilídeo em Minas Gerais, apesar de David et al. (2006a) terem coletado a espécie em Poços de Caldas no mesmo ano, e em 2002, a espécie foi encontrada em diversos estados do nordeste (MACHADO et al., 2005), atingindo o estado de Tocantins e a Região Norte em 2003 (SANTOS et al., 2003; MATA et al., 2004). Recentemente, *Z. indianus* atingiu países da América Central e do Norte: o Panamá, em 2003, e a Flórida, no Estado Unidos, em 2005 (VAN DER LINDE et al., 2006). A Figura 2 apresenta um mapa da distribuição de *Z. indianus* pelo mundo, com o provável período de colonização. Destaque é dado ao Brasil nessa Figura.



Figura 2. Rota de migração, segundo registros obtidos por diversos pesquisadores, da dispersão de *Z. indianus* pelo mundo, com destaque para o processo no Brasil.

O interesse no estudo da espécie está diretamente relacionado a sua invasão recente nas regiões Neotropicais, sendo considerada hoje uma espécie semi cosmopolita (VILELA, 1999; TIDÓN et al., 2003; SILVA et al., 2005ab). Esta rápida expansão

somada à escassez de informações sobre *Z. indianus* motivaram dezenas de pesquisadores a investigar o processo invasivo da mosca do figo. Muitos estudos foram realizados e vários momentos do processo invasivo foram registrados, onde foram utilizados os mais diversos marcadores, desde caracteres quantitativos, polimorfismos aloenzimáticos, DNA mitocondrial, análises ecológicas até genoma total.

A variação em traços quantitativos pode ser um bom retrato da quantidade de variabilidade genética de uma espécie bem como um indicativo para potencial plasticidade fenotípica e exploração de nichos. Loh e Bitner-Mathé (2005) detectaram variações significantes no tamanho e na forma da asa em populações de *Z. indianus* do Rio de Janeiro. David et al. (2006a) analisaram três caracteres quantitativos (tamanho das asas e do tórax e número de cerdas esternopleurais) em populações africanas, indianas e brasileiras de *Z. indianus* e encontraram variações clinais para as populações indianas e, menos marcadamente, para as africanas, mas não para as populações brasileiras, que apresentaram diferenças significantes nas comparações intralinhagens. A partir desses dados, os autores sugeriram que o propágulo que colonizou o Brasil era bastante numeroso a ponto de conter quantidade suficiente de variabilidade genética que prevenisse algum eventual efeito de “gargalo”, mas que a colonização foi bastante recente e, por isso, clinas para traços quantitativos não foram detectadas.

David et al. (2006a) também sugeriram, considerando o tamanho do corpo médio dos indivíduos das populações brasileiras de *Z. indianus*, que a provável origem do propágulo fundador é africana, sobretudo de regiões de alta-latidade (regiões sul-africanas). David et al. (2006b) compararam populações geográficas brasileiras de *Z. indianus* com linhagens massais de populações africanas e não detectaram diferenças significantes nas comparações, o que reforça a origem africana das populações brasileiras.

Outros dados que reforçam a origem africana do propágulo fundador de *Z. indianus* são os de Ananina et al. (2007) utilizando como ferramentas inversões cromossômicas. Somente uma inversão daquelas encontradas Gupta e Kumar (1987), a In(II)A, foi detectada em populações brasileiras. Porém, os resultados desses autores indicaram uma alta prevalência dessa inversão em populações indianas, enquanto os dados de Ananina et al. (2007) mostraram que essa inversão é bastante rara em

populações brasileiras, além de descreverem outras cinco inversões não detectadas em populações indianas: In(X)Na, In(X)Ke, In(X)Eg, In(V)B e In(IV)EF. Os dados indicam que as populações fundadoras foram bastante numerosas, considerando a quantidade de polimorfismos de inversões, além da provável origem não ser indiana graças ao grande número de inversões detectado nas populações brasileiras, mas não nas populações indianas.

O cariótipo-padrão de glândula salivar de *Z. indianus* (GUPTA; KUMAR, 1987; ANANINA et al., 2007) é constituído de cinco pares de cromossomos acrocêntricos e um par de cromossomos em ponto ($2n=12$), sendo seus politênicos divididos em 101 regiões, 20 para cada acrocêntrico e 1 para o cromossomo de ponto. O tamanho do genoma estimado por citometria de fluxo neste drosofilídeo varia de 0.601pg, em populações indianas, a 0.630pg, em populações africanas, e 0.635pg, em populações brasileiras (NARDON et al., 2005). O tamanho do genoma relativamente menor de populações indianas sugeriria uma provável origem evolutiva do drosofilídeo nessa região (NARDON et al., 2005), mas também poderiam indicar maior similaridade entre populações brasileiras e africanas, que apresentaram tamanho de genoma equivalente, o que reforçaria que as populações fundadoras brasileiras pudessem ter vindo da África.

O genoma pode fornecer informações preciosas a partir do produto gênico de aloenzimas. Apesar das populações indianas terem sido bem estudadas com esse marcador, poucos foram os trabalhos que investigaram populações brasileiras utilizando-o. Dentre os dados publicados destacam-se os trabalhos de Galego et al. (2004, 2006) e os de Machado et al. (2005).

Ambos os artigos de Galego et al. (2004, 2006) exploraram as aloenzimas esterásicas de *Z. indianus*, sendo o primeiro um estudo da variação temporal dos polimorfismos desta aloenzima em uma população de Mirassol (SP) e o segundo uma caracterização bioquímica das esterases. Galego et al. (2006) observaram que existem pelo menos seis locos codificadores de esterases em *Z. indianus*, dos quais quatro são de α -esterases (Est-1, Est-3, Est-4 e Est-6) e dois de β -esterases (Est-2 e Est-5). Desses, apenas um codifica colinesterases (Est-6), enzimas associadas à transmissão do impulso nervoso, e os demais carboxilesterases, que apresentam múltiplas funções em insetos. Dois desses locos são polimórficos, Est-3, com quatro alelos (Est-3¹, Est-3², Est-3³ e Est-

3⁴) e Est-2, com dois alelos (Est-3¹ e Est-3²), e as funções sugeridas para as enzimas por eles codificadas são, respectivamente, atividade digestória e biologia reprodutiva. Galego et al. (2004) encontraram ainda uma distribuição temporal, ainda que não estatisticamente significativa, desses polimorfismos ao longo do ano.

Machado et al. (2005) enfocaram a distribuição de polimorfismos de cinco locos aloenzimáticos (Acp, Pgm, Idh, Hk e Est-3) em populações brasileiras, asiáticas e africanas de *Z. indianus* e detectaram um baixo F_{ST} entre as populações brasileiras, sugerindo a colonização por um único propágulo e rápida expansão subsequente. Apesar dos autores não terem sugerido a origem do propágulo, eles afirmaram que provavelmente ele carregou quase todo polimorfismo existente na população ancestral.

O genoma ainda fornece informações elucidativas por meio das variações entre seqüências de nucleotídeos em diferentes populações. Por exemplo, a análise do polimorfismo dos marcadores COI e do gene ortólogo ao Est-6 de *D. melanogaster*, em 19 populações de *Z. indianus*, permitiu ampliar o conhecimento sobre a dispersão de *Z. indianus* pelos continentes (COMMAR et al., 2011, submetido). Os dados corroboram a origem africana de *Z. indianus* (ANANINA et al. 2007; DAVID et al. 2006 ab; GALEGO, CARARETO 2007, YASSIN et al., 2008ab), entretanto, revelam duas introduções no Brasil, ao invés de uma única, como previamente sugerido (MACHADO et al., 2005; DAVID et al., 2006 ab; GALEGO; CARARETO, 2007). Duas, ou mais introduções, não são inesperadas, pois durante os últimos 100 anos, as atividades humanas, especialmente viagens internacionais e o comércio, tem contornado os entraves das barreiras biológicas naturais, as espécies estão invadindo os continentes sob uma crescente taxa (TIDON et al. 2002). Além disso, a análise evidencia que nas populações da América do Sul e do Norte (Flórida) encontram-se indivíduos compartilhando o mesmo haplótipo, indicando que a dispersão da espécie para a América do Norte deu-se a partir de migrantes de populações brasileiras, e não africanas ou asiáticas. Esse trabalho demonstra que o processo de dispersão de *Z. indianus* é bem mais complexo, do que o previamente sugerido, uma única introdução a partir de um propágulo numeroso (MACHADO et al., 2005; DAVID et al., 2006b). No entanto, uma análise mais ampla dos continentes, por meio de diversas populações, poderia desvendar e sugerir uma rota de dispersão mais precisa deste drosofilídeo.

Características biológicas de *Zaprionus indianus* associadas ao processo de colonização na região Neotropical

No Brasil, *Z. indianus* adotou um comportamento, nunca antes observado, entre os drosofilídeos, colonizando frutos antes de sua maturação, tornando-os, assim, inadequados ao consumo humano e causando danos na comercialização (VILELA et al., 2001). Apesar de não ser considerada uma praga em seu local de origem, a bioinvasão deste drosofilídeo no Brasil trouxe prejuízos à agricultura, onde *Z. indianus* foi classificada como praga e responsável pela perda de 40% da safra de figo (*Ficus carica*), em 1999, na principal região produtora do estado de São Paulo (TIDON et al., 2003), devido a oviposição e o desenvolvimento de suas larvas nos frutos (STEIN et al. 2000). Várias técnicas de controle foram testadas, visto que a aplicação de inseticidas mostrou-se ineficaz contra a praga (RAGA, 2002). Uma delas, implementada por Raga et al. (2003) consistiu na utilização de protetores de ostíolos (etiqueta adesiva, calda bordalesa e gel), que apresentou uma considerável eficiência no controle da então praga. Outra técnica foi a utilização de atrativos alimentares tanto para o monitoramento quanto o controle de pragas. Os espécimes de *Z. indianus* foram mais atraídos, segundo Raga et al. (2006), por iscas de melão e melão e laranja, em cultivares de *Citrus*. Embora tenha outros frutos hospedeiros, como cítricos, goiaba, acerola e caqui (SOUZA FILHO et al., 2000), *Z. indianus* não se tornou praga nessas culturas. Felizmente, o aspecto de praga agrícola parece ter sido um evento pontual (LINDE et al., 2006), que caracterizou a introdução de *Z. indianus* no Brasil. Outros drosofilídeos já demonstraram seu potencial invasivo como *D. melanogaster* (DAVI; CAPY, 1988), *D. subobscura* (AYALA et al., 1989; HUEY et al., 2000), *D. simulans* (HAMBLIN; VEUILLE, 1999), *D. malerkotliana* (VOGL et al., 2003) e *D. ananassae* (VAL; SENE, 1980), mas nenhuma delas apresentou um impacto tão representativo quanto àquele provocado por *Z. indianus*.

Algumas características em *Z. indianus* como por exemplo a variabilidade do tamanho do corpo, mostraram-se sempre muito grandes e semelhantes entre as populações encontradas nos diferentes continentes (YASSIN et al. 2009b). O papel do tamanho do corpo para o sucesso de espécies invasoras havia sido fortemente implicado em estudos anteriores (CASSEY, 2000; ROY et al., 2002; FISHER; OWENS, 2004). Foi observada em uma população do delta do Nilo, uma variabilidade no tamanho das moscas

(YASSIN et al., 2007). Os autores sugeriram que essa variabilidade seria uma consequência de ambiente muito heterogêneo, sob um clima mediterrânico, incluindo a temperatura quente, *stress*, desidratação, além de tratamentos a inseticidas. Contrariamente às expectativas dos autores, que analisaram populações naturais de clima úmido, foi observado uma variabilidade muito semelhante com populações que vive sob um clima seco e mais estressante (YASSIN et al., 2009b). Essa elevada variabilidade fenotípica em *Z. indianus* pode ser uma propriedade intrínseca desta espécie invasora, relacionada à capacidade de utilizar uma ampla diversidade de recursos e microhabitats.

Outros trabalhos caracterizaram o potencial invasivo da espécie, enfocando o ciclo de vida (AMOUDI et al., 1991), a competição larval (Amoudi et al., 1993a) e os componentes do valor adaptativo (AMOUDI et al., 1993b) em linhagens oriundas da Arábia Saudita. Amoudi et al. (1993b), por exemplo, demonstraram que a temperatura limite para o desenvolvimento e longevidade das moscas estão entre 30°C a 35°C, demonstrando que a 35°C já ocorre uma diminuição no desenvolvimento de pupas em adulto. No entanto, a temperatura ótima para o sucesso do desenvolvimento das moscas encontra-se entre 20°C e 30°C. Essa variação de temperatura pode ser considerado um fator importante para o estabelecimento desta espécie nos mais variados ambientes, como verificado na Arábia Saudita, em que a média de temperaturas elevadas são frequentes em muitos dias do ano durante o verão.

De acordo com dados aloenzimáticos obtidos por Galego e Carareto (2007), a distribuição da variabilidade genética do loco Est-3 de *Z. indianus* está relacionada com ação da seleção natural, tanto exercida por inseticidas quanto oriunda de variações climáticas. Essa plasticidade encontrada na distribuição das frequências alélicas do loco Est-3 pode ser também uma das características que contribuiu para o sucesso na dispersão desse organismo, principalmente ao longo do continente americano (GALEGO; CARARETO, 2007).

Até o final da década de 90, eram escassos os trabalhos referentes aos componentes da história da vida de *Z. indianus*. Os trabalhos de Stein et al. (2003) e de Setta e Carareto (2005) contribuíram significativamente para a compreensão do ciclo de vida em *Z. indianus*. A longevidade em ambos os estudos foi maior que a encontrada para *Z. indianus* de procedência indiana (BAINSET et al., 1995, 1996) e similares aos dados

para as populações de origem saudita (AMOUDI et al., 1991, 1993a). A produtividade da espécie foi similar ou maior que a de outros drosofilídeos e o tempo de desenvolvimento bastante similar ao de *D. sturtevantii*. Esses resultados indicam uma estratégia *r* de colonização de ambientes, a qual é fortemente relacionada à bioinvasores.

Os componentes do valor adaptativo como o tempo de desenvolvimento, produtividade e período fértil estão fortemente vinculados à biologia reprodutiva das espécies. A fecundidade e a produtividade são diretamente relacionadas à produção de óvulos e espermatozóides. Araripe et al. (2004) demonstraram que a viabilidade dos gametas masculinos de *Z. indianus* é dependente da temperatura, de forma que temperaturas ambientais muito baixas produzem esterilidade em machos e que se o desenvolvimento ocorrer em ambientes com temperaturas de 15°C, 100% deles são estéreis. Esta redução drástica na capacidade reprodutiva poderia explicar porque *Z. indianus* não é encontrada em regiões de grandes latitudes, conforme já relatado por Chassagnard e Kraaijeveld (1991) e Goñi et al. (2001, 2002). No entanto, não sabemos como a espécie sobrevive a períodos de frio, se existe diapausa ou a recuperação das populações por reintroduções. Uma hipótese sugerida por Danni (1980) é a formação de ilhas de calor na regiões frias, como por exemplo na cidade de Porto Alegre, como um fenômeno associado à urbanização. Estas ilhas térmicas poderiam então ser utilizadas como refúgios para populações urbanas de insetos durante os períodos desfavoráveis.

Uma distribuição da abundância de *Z. indianus* em diferentes ecossistemas pode ser construída a partir dos resultados publicados por Tidon et al. (2003), Silva et al. (2005a), Ferreira e Tidon (2005) e Schmitz et al. (2007). A maior parte dos dados foi registrada entre 2000 e 2002, mas pode-se observar uma redução significativa da abundância, logo após o grande tamanho demográfico das populações do drosofilídeo logo no início da sua introdução (1999-2001). Tidon et al. (2003) analisaram abundância das populações de *Z. indianus* no Cerrado e em Floresta de Galeria, demonstrando uma abundância maior no Cerrado nos períodos úmidos. Nas estações primavera e verão a abundância apresentou elevada em três parques distintos do Rio Grande do Sul, de acordo com Silva et al. (2005b). Ferreira e Tidon (2005) e Schmitz et al. (2007) observaram que em ambientes de cerrado muito, medianamente e pouco urbanizado apresentam uma abundância maior de *Z. indianus* quando comparado com manguezal. Dessa forma é

provável que a oscilação populacional de *Z. indianus* seja um reflexo direto das variações climáticas ao longo do ano.

Além de sua ampla distribuição, a abundância relativa de suas populações sugere que *Z. indianus* é uma espécie com alto poder de competição, porém levantamentos faunísticos mais recentes têm indicado uma diminuição desta abundância nas regiões invadidas, o que indicaria a evolução de coexistência entre *Z. indianus* e espécies nativas. Um mecanismo de controle desta abundância pode ser similar ao descrito pelo estudo de Galego e Carareto (2005) sobre competição larval. Esse estudo indicou redução na viabilidade de *Z. indianus* na presença de resíduos larvais de *D. sturtevantii*, enquanto os da mosca do figo interferiram tanto na viabilidade de *D. simulans* quanto no tempo de desenvolvimento de ambas as espécies de *Drosophila*. Neste caso, as interações competitivas entre *Z. indianus* e outros drosofilídeos poderia ser um, mas não o único agente controlador do tamanho populacional de *Z. indianus*.

Como verificado anteriormente, vários são os fatores relacionados ao sucesso invasivo de *Z. indianus*, como tolerância a temperaturas, ocupação de vários nichos, utilizando de uma grande diversidade de plantas para obtenção de alimento, entre outros. A coexistência com espécies nativas também tem demonstrado ser um fator importante para o estabelecimento dessa espécie nas diferentes invasões entre os continentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L.M.; CARARETO, C.M. Sequence heterogeneity and phylogenetic relationships between the *copia* retrotransposon in *Drosophila* species of the *repleta* and *melanogaster* groups. **Genet. Sel. Evol.** v.38, p.535–550, 2006.

AMOUDI, M.A.; DIAB, F.M.; ABOU-FANNAH, S.S.M. *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera: Drosophilidae) in Saudi Arabia and the effect of temperature on the life cycle. **J. King Saud Univ. Agri.**, v. 3, p.25-35, 1991.

AMOUDI, M.A.; DIAB, F.M.; ABOU-FANNAH, S.S.M. Effects of larval population density on the life cycle parameters in *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera: Drosophilidae). **Pakistan J. Zool.** v.25, n.1, p.37-40, 1993a.

AMOUDI, M.A.; DIAB, F.M.; ABOU-FANNAH, S.S.M. The influence of low temperature on development, adult longevity and productivity of *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera: Drosophilidae). **J. King Saud Univ. Agri.**, v. 5, p.263-274, 1993b.

ANANINA, G.; ROHDE, C.; DAVID, J.R.; VALENTE, V.L.; KLACZKO, L.B. Inversion polymorphism and a new polytene chromosome map of *Zaprionus indianus* Gupta (1970)(Diptera: Drosophilidae). **Genet.**, 2007.

ARARIPE, L.O.; KLACZKO, L.B.; MORETEAU, B.; DAVID, J.R. Male sterility thresholds, in a tropical cosmopolitan drosophilid, *Zaprionus indianus*. **J. Thermal Biol.**, v.29, n.2, p.73-80, 2004.

ATKINSON, D.; SIBLY, R.M. Why are organisms usually bigger in colder environments? Making sense of a life history puzzle. **Trends. Ecol. Evol.**, v.12, p.235-239, 1997.

AYALA, F.R.; SERRA, L.L.; PREVOSTI, A. A grand experiment in evolution: the *Drosophila subobscura* colonization of the America. **Genome**, v.31, p.246-255, 1989.

AZEVEDO, R.B.R.; JAMES, A.C.; McCABE, J.; PATRIDGE, L. Latitudinal variation of wing: thorax size ratio and wing aspect ratio in *Drosophila melanogaster*. **Evolution**, v.52, p.1353-1362, 1998.

BAINS, J.S.; KAKAR, R.; SHARMA, S.P.; GARG, S.K. Longevity as affected by vitamin feeding in banana fruit fly, *Zaprionus paravittiger*. **Bio-sci. Res. Bull.**, v.5-7, n.1-2, p.13-16, 1995.

BAINS, J.S.; KAKKAR, R.; SHARMA, S.P. Gender specific alterations in antioxidant status of aging *Zaprionus paravittiger* fed on propyl gallate. **Biochem. Molec. Biol. Int.**, v.40, n.4, p.731-740, 1996.

BRADY, J. P.; RICHMOND, R. C.; OAKESHOTT, J. G. Cloning of the esterase-5 locus from *Drosophila pseudoobscura* and comparison with its homologue in *D. melanogaster*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 7, p. 525-546, 1990.

BRUNET, F.; GODIN, F.; BAZIN, C.; CAPY, P. Phylogenetic analysis of Mos1-like transposable elements in the Drosophilidae. **J Mol Evol.** v.6, p.760-768, 1999.

CASSEY, P. Life history and ecology influences establishment success of introduced land birds, **Biol. J. Linn. Soc.** v.76, p. 465–480, 2000.

CASTRO, F.L.; VALENTE, V.L.S. *Zaprionus indianus* invading communities in the southern Brazilian city of Porto Alegre. **Dros. Inf. Serv.**, v.84, p.15-17, 2001.

CHASSAGNARD, M. Les espèces africaines du sous-genre *Zaprionus* S.STR. à six bandes thoraciques (Diptera: Drosophilidae) **Ann. Soc. Entomol. Fr.**, v. 32, n. 1, p. 59-65. 1996.

CHASSAGNARD, M.; KRAAIJEVELD, A.R. The occurrence of *Zaprionus* sensu stricto in the palearctic region (Diptera: Drosophilidae). **Annls. Soc. Ent. Fr.**, v.27, n.4, p.495-496, 1991.

CHASSAGNARD, M.; TSACAS, L. Les sous-genre *Zaprionus* S.STR. Définition de groupes d'espèces et révision du sous-groupe *vittiger* (Diptera: Drosophilidae) **Ann. Soc. Entomol. Fr.**, v. 29, n. 2, p. 173-194. 1993.

COMMAR et al. The intercontinental dispersion scenario of drosophilid *Zaprionus indianus* revealed by mitochondrial and nuclear markers. **Biological Invasion**, (2011, submitted).

COQUILLET, D.W. New Diptera in the U.S. National Museum. **Proceedings of the United States National Museum.** v. 23, p. 593–618, 1901.

DALAGE, J.L.; KERGOAT, G.J.; MACZKOWIAK, F.; SILVAIN, J.F.; CARIOU, M.L.; LACHAISE, D. A phylogeny of Drosophilidae using the *Amyrel* gene: questioning the *Drosophila melanogaster* species group boundaries. *Journal of Zoological Systematics & Evolutionary Research*, v.45, n1. p.47-63, 2007.

DANNI, I. M. A ilha térmica de Porto Alegre: contribuição ao estudo do clima urbano. **Boletim Gaúcho de Geografia.** v.8, p.33-47, 1980.

DAVID, J.R.; ARARIPE, L.O.; BITNER-MATHE, B.C.; CAPY, P.; GONI, B.; KLACZO, L.B.; LEGOUT, H.; MARTINS, M.B.; VOUIDIBIO, J.; YASSIN, A.; MORETEAU, B. Sexual dimorphism of body size and sternopleural bristle number: a comparison of geographic population of an invasive cosmopolitan drosophilid. **Genetics**, v.128, n.1-3, p.109-122, 2006a.

DAVID, J.R.; ARARIPE, L.O.; BITNER-MATHE, B.C.; CAPY, P.; GONI, B.; KLACZO, L.B.; LEGOUT, H.; MARTINS, M.B.; VOUIDIBIO, J.; YASSIN, A.; MORETEAU, B. Quantitative trait analyses and geographic variability of natural populations of *Zaprionus indianus*, a recent invader in Brazil. **Heredity**, v.96, n.1, p.53-62, 2006b.

DAVID, J.R.; CAPY, P. Genetic variation of *Drosophila melanogaster* natural populations. **Trends in Genetics**, v.4, p.106-111, 1988.

DAVID, J.R.; MORETEAU, B.; GAUTHIER, J.P.; PÉTAVY, G.; STOCKEL, J.; IMASHEVA, A.G. Reaction norms of size characters in relation to growth temperature in *Drosophila melanogaster*: an isofemale lines analyses. **Genet. Sel. Evol.**, v.26, p.229-251, 1994.

DE ALMEIDA, L.M.; CARARETO, C.M. Sequence heterogeneity and phylogenetic relationships between the copia retrotransposon in *Drosophila* species of the *repleta* and *melanogaster* groups. **Genet Sel Evol.** v.5, p.535-550, 2006.

DEPRÁ, M.; PANZERA, Y.; LUDWIG, A.; VALENTE, V.L.; LORETO EL. Hosimary: a new hAT transposon group involved in horizontal transfer. **Mol. Genet. Genom.** v.5, p.451-459, 2010.

DE SETTA, N.; CARARETO, C.M.A. Fitness components of a recently-established population of *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae) in Brazil. **Iheringia Zool.**, v.95, n.1, p.47-51, 2005.

DE SETTA, N.; VAN SLUYS, M.A.; CAPY, P.; CARARETO, C.M. Multiple invasions of Gypsy and Micropia retroelements in genus *Zaprionus* and *melanogaster* subgroup of the genus *Drosophila*. **BMC Evol Biol.** v.9: p.279, 2009.

DE SETTA, N.; VAN SLUYS, M.A.; CAPY, P., CARARETO, C.M. Copia retrotransposon in the *Zaprionus* genus: another case of transposable element sharing with the *Drosophila melanogaster* subgroup. **Journal of Molecular Evolution** DOI: 10.1007/s00239-011-9435-6, 2011.

De SALLE, R. The phylogenetic relationships of flies in the family Drosophilidae deduced from mtDNA sequences. **Mol. Phyl. Evol.**, v.1, p.31-40, 1992.

DURANDO, C.M.; BAKER, R.H.; ETGES, W.J.; HEED, W.; WASSERMAN, M.; DESALLE, R. Phylogenetic analysis of the *repleta* species group of the genus *Drosophila* using multiple sources of characters, **Mol. Phylogenet. Evol.** v.16, p.296-307, 2000.

ELIAS, E.B. Ecological genetics and cytogenetic studies on two closely-related drosophilids, *Zaprionus indianus* and *Z. tuberculatus*, **Dissertation**, University of Alexandria, Egypt, 2005.

FERREIRA, L.B.; TIDON, R. Colonizing potential of Drosophilidae (Insecta, Diptera) in environments with different grades of urbanization. **Biodiversity Conservation**, v.14, n.8, p.1809-1821, 2005.

FISHER, D.O.; OWENS, I.P.F. The comparative method in conservation biology. **Trends Ecol. Evol.** v.19, p.391–398, 2004.

FRANÇA, F. M. C.; GONDIN, R. S. Rede da irrigação – Documento nº 1 (Mercado de frutas e hortaliças). Disponível em http://www.bnb.gov.br/content/Aplicacao/ETENE/Rede_Irigacao/Docs/Fruticultura%20I-%20Uma%20visao%20geral%20do%20mercado.PDF, acesso em 29/04/2007, 1999.

GALEGO, L.G.C.; CERON, C.R.; CARARETO, C.M.A. Variação temporal das frequências alélicas do loco Est-3 de *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). **Revista UNORP: Saúde**, v.3, n.10, p.97-114, 2004.

GALEGO, L.G.C.; CERON, C.R.; CARARETO, C.M.A. Characterization of esterases in a Brazilian Population of *Zaprionus Indianus* (Diptera: Drosophilidae). **Genet.**, v126, p.89-99, 2006.

GALEGO L. G; CERON C. R; CARARETO, C. M. Analysis of the drosophilid *Zaprionus indianus* introduction in Brazil: contribution of esterase loci polymorphisms. **Dros. Inf. Serv.**, v.90, p.79-84, 2007.

GALEGO, L.G.; CERON, C.R.; CARARETO, C.M. Scenario for the spreading of the invasive species *Zaprionus indianus* Gupta 1970 (Diptera: Drosophilidae) throughout Brazil. **Genet Mol Biol** v.33, p.767-773, 2010.

GHEERBRANT, E., RAGE, J.-C. Paleobiogeography of Africa: how distinct from Gondwana and Laurasia? **Paleogeogr. Paleoclimatol. Paleoecol.** v. 241, 224–246, 2006.

GOMES, L.H.; ECHEVERRIGARAY, S.; CONTI, J.H.; LOURENCO, M.; VINICIUS, M.; DUARTE, K.M.R. Presence of the yeast *Candida tropicalis* in figs infected by the fruit fly *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). **Revta Microbiol.**, v.34, n.1, p. 5-7, 2003.

GOÑI, B.; FRESIA, P.; CALVIÑO, M.; FERREIRO, M.J.; VALENTE, V.L.S.; BASSO DA SILVA, L. First record of *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae) in southern localities of Uruguay, South America. **Dros. Inf. Serv.**, v.84, p.61-65, 2001.

GOÑI, B.; MARTINEZ, M.E.; TECHERA, G.; FRESIA, P. Increased frequencies of *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae) in Uruguay. **Dros. Inf. Serv.**, v.85, p.75-80, 2002.

GRIMALDI, D.A. A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v.197, p.1–139, 1990.

GUPTA, J.P. Description of a new species of *Phorticella* and *Zaprionus* (Drosophilidae) from India. **Proceedings of the Indian Science Academy**, v.36B, p.62-70, 1970.

GUPTA, J.P.; KUMAR, A. Cytogenetics of *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera: Drosophilidae): nucleolar organizer regions, mitotic and polytene chromosomes and inversion polymorphism. **Genet.**, v.74, n.1, p.19-25, 1987.

GUPTA, K.K.; GUPTA, J.P. Four new and two unrecorded species of Drosophilidae from India (Insecta: Diptera). **Proc. Zool. Soc. Calcutá**, v.44, n.2, p.110-126, 1991.

HAMBLIN, M.T.; VEUILLE, M. Population structure among African and derived populations of *Drosophila simulans*: evidence for ancient subdivision and recent admixture. **Genetics**, v. 153, p.305-317, 1999.

HEDRICK, P.W. **Genetics of Populations**. Science Books International, Boston, p.629, 1983.

HERERDIA, F.; LORETO, E.L.; VALENTE, V.L. Complex evolution of gypsy in Drosophilid species. **Mol Biol Evol.** v.10, p.1831-1842, 2004.

HUEY, R.B.; GILCHRIST, G.W.; CARLSON, M.L.; BERRIGAN, D.; SERRA, L. Rapid evolution of a geographic cline in size in a introduced fly. **Science**, v.287, p.308-309, 2000.

JAMES, A.C.; AZEVEDO, R.B.R; PATRIDGE, L. Genetic and environmental responses to temperature of *Drosophila melanogaster* from latitudinal cline. **Genetics**, v.146, p.881-890, 1997.

KARAN, D.; DUBEY, S.; MORETEAU, B.; PARKASH, R.; DAVID, J.R. Geographical clines for quantitative traits in natural populations of a tropical drosophilid: *Zaprionus indianus*. **Genet.**, v.108, p.91-100, 2000.

KARAN, D.; MORETEAU, B.; DAVID, J.R. Growth temperature and reaction norms of morphometrical traits in a tropical drosophilid: *Zaprionus indianus*. **Heredity**, v.83, p.398-407, 1999.

KATO, C.M.; FOUREAUX, L.V.; CÉSAR, R.A.; TORRES, M.P. Ocorrência de *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae) no estado de Minas Gerais. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v.28, n.2, p.454-455, 2004.

KWIATOWSKI, J; SKARECKY, D.; BAILEY, K.; AYALA, F.J. Phylogeny of *Drosophila* and related genera inferred from the nucleotide sequence of the Cu, Zn Sod gene. **J. Mol. Evol.**, v.38, p.443-454, 1994.

KWIATOWSKI, J.; AYALA, F.J. Phylogeny of *Drosophila* and related genera: conflict between molecular and anatomical analyses. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.13, p.319–328, 1999.

LACHAISE, D.; SILVAIN, J.F. How two Afrotropical endemics made two cosmopolitan human commensals: the *Drosophila melanogaster*-*D. simulans* palaeogeographic riddle. **Genet.** v.120, p.17–39, 2004.

LEÃO, B.F.D.; TIDON, R. Newly invading species exploiting native host-plants: the case of the African *Zaprionus indianus* (Gupta) in the Brazilian Cerrado (Diptera, Drosophilidae). **Annls Soc. ent. Fr.**, v.40 ,n.3-4, p.285-290, 2004.

LOH, R.; BITNER-MATHE, B.C. Variability of wing size and shape in three populations of a recent Brazilian invader *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) from different habitats. **Genet.**, v.125, n.2-3, p.271-281, 2005.

MACHADO, T.; SOLÉ-CAVA, A.M.; DAVID, J.R.; BITNER-MATHÉ, B.C. Allozyme variability in an invasive drosophilid, *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae): comparison of a recently introduced Brazilian population with Old World populations. **Ann. Soc. Fr.**, v.41, p.7-13, 2005.

MARUYAMA, K.; HARTL, D.L. Evidence for interspecific transfer of the transposable element mariner between *Drosophila* and *Zaprionus*. **J Mol Evol.** v.6, p.514-524, 1991.

MATA, R.M.; KANEGAE, M.F.;TIDON, R. .Diagnóstico ambiental do Parque estadual do Jalapão mediante a análise da fauna de Drosofilídeos (Insecta, Díptera). XXV Congresso Brasileiro de Zoologia, 2004. Abstract, <http://www.zoologia.bio.br/congressos/CBZ/resumos/XXVCBZcompleto-111.html> (April 5, 2009).

NARDON, C.; DECELIERE, G.; LOVENBRUCK, C.; WEISS, M.; VIEIRA, C.; BIEMONT, C. Is genome size influenced by colonization of new environments in dipteran species? **Mol. Ecol.**, v.14, n.3, p.869-878, 2005.

OKADA, T.; CARSON, H.L. The genera *Phorticella* Duda and *Zaprionus* Coquillett (Diptera: Drosophilidae) of the oriental region and New Guinea. **Kontyû**, v.51, p.539-553, 1983.

OKADA, T. New taxonomic changes in the family Drosophilidae (Diptera). **Japanese Journal of Entomology**, Japão, v.5, p. 154, 1990

PARKASH, R.; SHAMINA,. Temporal patterns of allozymic variation in two colonizing drosophilids. **Dros. Inf. Serv.**, v.72, p.96-97, 1993.

PARKASH, R.; SHARMA, S. Cryptic genic variability in *Zaprionus indianus* populations. **Dros. Inf. Serv.**, v.72, p.94-95, 1993.

PARKASH, R.; YADAV, J.P. Geographical clinal variation at seven esterase encoding loci in Indian populations of *Zaprionus indianus*. **Hereditas**, v.119, p.161-173, 1993a.

PARKASH, R.; YADAV, J.P. Latitudinal clinal variation in *Zaprionus indianus* populations. **Dros. Inf. Serv.**, v.72, p.150-152, 1993b.

PARKASH, R.; YADAV, J.P.; VASHIST, M. Electrophoretic and cryptic genic variability in natural populations of *Zaprionus indianus*. **Proc. Indian natn. Sci. Acad.**, v.B60, n.1, p.75-82, 1994.

PELANDAKIS, M.; HIGGINS, D.G.; SOLIGNAC, M. Molecular phylogeny of the subgenus *Sophophora* of *Drosophila* derived from large subunit of ribosomal RNA sequences. **Genetics**, v.84, p.87-94, 1991.

PELANDAKIS, M.; SOLIGNAC, M. Molecular phylogeny of *Drosophila* based on ribosomal RNA sequences. **J. Mol. Evol.**, v.37, p.525-543, 1993.

POWELL, J.R. Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The *Drosophila* Model., **Oxford University Press**, New York, 1997.

POWELL, J.R.; DE SALLE, R. *Drosophila* molecular phylogenies and their uses. In: Hecht, M.K. (Ed.), **Evolutionary Biology**. **Plenum**, New York, pp. 87-139, 1995.

RAGA, A.; MACHADO, R.A.; DINARDO, W.; STRIKIS, P.C. Eficácia de atrativos alimentares na captura de moscas-das-frutas em pomar de citros. **Bragantia**, v.65, n.2, p.337-345, 2006.

RAGA, A.; SOUZA FILHO, M.F.; SATO, M.E. Eficiência de protetores de ostíolo do figo sobre a infestação da mosca *Zaprionus indianus* (Gupta) (Diptera: Drosophilidae) no campo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, n.3, p.287-289, 2003.

RAGA, A.; PRESTES, D.A.O.; SOUZA FILHO, M.F.; SATO, M.E.; SILOTO, R.C.; ZUCCHI, R.A. Occurrence of fruit flies in coffee varieties in the state of São Paulo, Brazil. **Boletín Sanidad Vegetal y Plagas**, Madrid, v.28, n.1, p.519-524, 2002.

REMSSEN, J.; DE SALLE, R. Character congruence of multiple data partitions and the origin of the Hawaiian Drosophilidae. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.9, p.225-235, 1998.

REMSSEN, J.; O'GRADY, P. Phylogeny of Drosophilinae (Diptera: Drosophilidae), with comments on combined analysis and character support. **Mol. Phylogenet. Evol.** v.24, p.249-264, 2002.

ROBE, L.J.; VALENTE, V.L.; BUDNIK, M.; LORETO, E.L. Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical

species and groups: a nuclear versus mitochondrial gene approach. **Mol Phylogenet Evol.**, v.36, p.623-40, 2005.

ROY, K.; JABLONSKI, D.; VALENTINE, J.W. Body size and invasion success in marine bivalves, **Ecol. Lett.** v.5, p.163–167, 2002.

RUSSO, C.A.M.; TAKEZAKI, N.; AND M. NEI, M. Molecular phylogeny and divergence times of drosophilid species. **Mol. Biol. Evol.**, v.12, p.391–404, 1995.

SANTOS, J.F.; RIEGER, T.T.; CAMPOS, S.R.C.; NASCIMENTO, A.C.C.; FELIX, P.T.; SILVA, S.V.O; FREITAS, F.M.R. Colonization of northeast region of Brazil by the drosophilid flies *Drosophila malerkotliana* e *Zaprionus indianus*, a new potential pest for Brazilian fruit culture. **Dros. Inf. Serv.**, v.86, p.92-95, 2003.

SERGEEV, P. V.; PANIN, V.M.; PALVLOVA, G.V.; KOPANTSEVA, M.R; SHOSTAK, N.G.; BASHKIROV, V.N.; GEORGIEV, G.P.; KOROCHKIN, L.I. The expression of esterase S gene of *Drosophila virilis* in *Drosophila melanogaster*. **FEBS Letters**, v. 360, p. 194-196, 1995.

SHAKOOI, A.R.; BUTT, U. Effect of thioacetamide on the development of a Drosophilid fly. 1. Morphological studies. **Pakistan J. Zool.**, v.11, p.315-328, 1979.

SILVA, N.M.; FANTINEL, C.; VALENTE, V.L.S.; VALIATI, V.H. Population dynamics of the invasive species *Zaprionus indianus* (Gupta) (Diptera: drosophilidae) in communities of drosophilids of Porto Alegre city, southern of Brazil. **Neotropical Ent.**, v.34, n.3, p.363-374, 2005a.

SILVA, N.M.; FANTINEL, C.C; VALENTE, V.L.S.; VALIATI, V.H. Ecology of colonizing populations of the figfly *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae) in Porto Alegre, Southern Brazil. **Iheringia Sér. Zool**, v.95, p.233-240, 2005b.

STALKER, H.D. Chromosomes studies in wild population of *Drosophila melanogaster*. II. Relationships of inversion frequencies to latitude, season, wing loading and flight activity. **Genetics**, v.95, p.211-223, 1980.

SOUZA FILHO, M. F.; DE PRESTES, D. A. O.; SATO, M. E.; RAGA, A. Host plants of *Zaprionus indianus* in the State of São Paulo, Brazil. **International Congress of Entomology**, 21. Embrapa Soja, v. 1, p. 294, 2000.

STEIN, C. P. Mosca do figo *Zaprionus indianus*. IAC- **Boletim eletrônico** (<http://www.iac.br/~cenfit/artigos/zaprionus/index/htm>), 15/03/2000.

STEIN, C.P.; TEIXEIRA, É.P.; NOVO, J.P.S. Aspectos biológicos da mosca do figo, *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae). **Entomotropica**, v.18, n.3, p.219-221, 2003.

TATARENKOV, A.; KWIATOWSKI, J.; SKARECKY, D.; BARRIO, E.; AYALA, F.J. On the evolution of *Dopa decarboxylase* (*Ddc*) and *Drosophila* systematics, **J. Mol. Evol.**, v.48, p.445–462, 1998.

TATARENKOV, A.; KWIATOWSKI, J.; SKARECKY, D.; BARRIO, E.; AYALA, F.J. On the evolution of *Dopa decarboxylase* (*Ddc*) and *Drosophila* systematics. **J Mol Evol.** v.48, p.445–462, 1999.

THOMAS R.H.; HUNT J.A. Phylogenetic relationships in *Drosophila*: a conflict between molecular and morphological data. **Mol. Biol. Evol.**, v.10, p.362–374, 1993.

THROCKMORTON, L.H. Problem of Phylogeny in the Genus *Drosophila*. **Univ. Texas Publ.**, v.6205, p.207–344, 1962.

THROCKMORTON, L.H. The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila*. In: R.C. King, Editor, **Handbook of Genetics**, Plenum Press, New York, v.3, p.421–469, 1975.

TIDON, R.; LEITE, D.F.; LEÃO, B.F.D. Impact of the colonisation of *Zaprionus* (Diptera, Drosophilidae) in different ecosystems of the Neotropical Region: 2 years after the invasion. **Biological Conservation.** v.112, p.299-305, 2003.

TIDON, R.; LEITE, D.F.; LEÃO, B.F.D. Impact of the colonization of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) in different ecosystems of the neotropical region: 2 years after the invasion. **Biological conservation**, v.112, p.299-305, 2003.

TSACAS, L. L'identité de *Zaprionus vittiger* Coquillet et révision des espèces afrotropicales afines. **Bull. Soc. Entomol. France**, v.85, p.141-154, 1980.

TSACAS, L. *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 nouveau nom pour le plus commun des *Zaprionus* africains (Diptera: Drosophilidae). **Annls. Soc. Ent. Fr.**v.21, p.343-344, 1985.

TSACAS, L.; LACHAISE, D.; DAVID, J. Composition and biogeography of the afrotropical drosophilid fauna. In: Ashburner, M.; Carson, H.L.I.; Thompson, J.N. (eds). **The genetics and biology of *Drosophila***. v.3a, Londres: Academic Press, p.197-259, 1981.

VAN DER LINDE, K.; STECK, G.J.; HIBBARD, K.; BIRDSLEY, J.S.; ALONSO, L.M.; HOULE, D. First records of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae), a pests species on commercial fruits from Panama and the United States of America. **Florida Entomologist**, v.89, n.3, p.402-403, 2006.

VAN DER LINDE, K; HOULE, D. A supertree analysis and literature review of the genus *Drosophila* and closely related genera (Diptera, Drosophilidae). **Insect Syst. Evol.** v.39, 241-267, 2008.

VAL, F.C.; SENE, F.M. A newly introduced *Drosophila* species in Brazil (Diptera: Drosophilidae). **Papéis avulsos do departamento de Zoologia da sociedade agrícola**, v.33, p.293-298, 1980.

VIDAL, N.M.; LUDWIG, A.; LORETO, E.L. Evolution of *Tom*, *297*, *17.6* and *rover* retrotransposons in Drosophilidae species. **Mol Genet Genomics**. v. 282, p.351–362, 2009.

VILELA, C.R. Is *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae) currently colonizing the Neotropical region? **Dros. Inf. Serv.** 82: 37-39, 1999.

VILELA, C.R.; TEIXEIRA, E.P.; STEIN, C.P. Mosca africana do figo, *Zaprionus indianus* (Díptera: Drosophilidae). In: VILELA, E.; ZUCCHI, R.A.; CANTOR, F. (eds) **Histórico e impacto de pragas introduzidas no Brasil**. Editora Holos, São Paulo, p.48-52, 2000.

VILELA, C.R.; TEIXEIRA, E.P.; STEIN, C.P. Mosca-africana-do-figo, *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). In: Vilela E, Zucchi RA, Cantor F (eds) **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil**. Editora Holos, São Paulo, 48-52, 2001.

VOGL, C.; DAS, A.; BEAUMONT, M.; MOHANTY, S.; STEPHAN, W. Population subdivision and molecular sequences variation: theory and analyses of *Drosophila ananassae* data. **Genetics**, v.165, p.1385-1395, 2003.

WHEELER, M.R. Additions to the catalog of the world's Drosophilidae. In: M. Ashburner, J.N., 1986.

WYNN, S.; TODA, M.J. Drosophilidae (Díptera) in Burma. IV. **The genus *Zaprionus*. Kontyû**, v.56, p.843-851, 1988.

YASSIN, A. A revision of the *tumiditarsus* group of the subgenus *Drosophila* and its relation to the genus *Zaprionus*. **Dros. Inf. Serv.**, v.90, p. 20-22, 2007.

YASSIN, A.; ARARIPE, L.O.; CAPY, P.; DA LAGE, J.L.; KLACZKO, L.B.; MAISONHAUTE, C.; OGÉREAU, D.; DAVID, J.R. Grafting the molecular phylogenetic tree with morphological branches to reconstruct the evolutionary history of the genus *Zaprionus* (Diptera: Drosophilidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, EUA, v. 47, p. 903-15, 2008a.

YASSIN A, CAPY P, MADI-RAVAZZI L, OGÉREAU D, DAVID JR. DNA barcode discovers two cryptic species and two geographical radiations in the invasive drosophilid *Zaprionus indianus*. **Mol Ecol Notes**. v.8, p. 491–501, 2008b.

YASSIN, A.; BORAI, F.; CAPY, P.; DAVID, J.R.; ELIAS, E.; RIAD, S.A., SHALABY, H.G.; SEROUR, S.; ABOU-YOUSSEF, A.Y. Evolutionary genetics of *Zaprionus*. II.

Mitochondrial DNA and chromosomal variation of the invasive drosophilid *Zaprionus indianus* in Egypt. **Mitochondrial DNA**. v.20, p. 34-40, 2009a.

YASSIN, A.; DAVID, J.R., BITNER-MATHÉ, B.C. Phenotypic variability of natural populations of an invasive drosophilid, *Zaprionus indianus*, on different continents: Comparison of wild-living and laboratory-grown flies **C. R. Biologies**. v.332, p. 898–908, 2009b.

6. DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A recente introdução e a explosiva dispersão de *Z. indianus* no Brasil tem proporcionado uma oportunidade única para o desenvolvimento de vários estudos genéticos, evolutivos e ecológicos com esse drosofilídeo, conhecido em nosso país como a mosca do figo.

Neste trabalho foi realizada uma análise genética e evolutiva utilizando amostras populacionais de *Z. indianus* com o propósito de se avaliar o polimorfismo de um fragmento gênico aqui considerado ortólogo ao do gene *Est-6* de *Drosophila melanogaster*. Foi observada uma elevada diversidade nucleotídica neste fragmento gênico, corroborando alguns estudos de polimorfismo de genes codificantes para esterases em *Drosophila* (VEUILLE; KING, 1995; BALAKIREV; AYALA, 2003). No entanto, essa diversidade nucleotídica quando comparada com a diversidade nucleotídica da sequência completa do gene *Est-6* de *D. melanogaster*, relatada na literatura, poderia estar superestimada por duas razões: em primeiro lugar, a sequência analisada do fragmento gênico de *Z. indianus* poderia ser naturalmente mais polimórfica, e em segundo, poderia estar relacionada ao tamanho populacional, desde que populações maiores podem acumular maior número de polimorfismo. Sabe-se que nos primeiros anos após a introdução de *Z. indianus* no Brasil as populações em diferentes localidades do país eram relativamente grandes. Essa alta diversidade nucleotídica pode ser uma particularidade desse gene, como também observada por Balakirev et al. (2006) em *D. melanogaster*. Ao contrário do obtido neste trabalho, análises moleculares e bioquímicas têm revelado um nível de variação genética baixo em populações americanas, o que poderia ser explicado pela sua recente introdução (MATOS MACHADO et al., 2005; NARDON et al., 2005; GALEGO et al., 2006, YASSIN et al., 2008). Entretanto, nossos resultados são concordantes com níveis de variabilidade genética estimados para traços quantitativos, que seriam esperados analisando se o propágulo invasor fosse bastante numeroso, como sugerido por David et al. (2006).

Vários estudos correlacionam a *EST-6* de *D. melanogaster* com diferentes β -esterases em outras espécies de *Drosophila* (SERGEEV et al., 1995; BRADY et al., 1990; BRADY; RICHMOND, 1992) sugerindo uma provável ortologia entre essas

esterases. Brady et. al. (1990) mostraram existir uma semelhança estrutural entre a EST-5 B de *D. pseudoobscura* e a EST-6 de *D. melanogaster*, devido à presença de muitos resíduos aromáticos semelhantes no sítio ativo destas enzimas, como também, à afinidade pelo substrato β -naftilacetato. Além disso, verificaram uma similaridade nucleotídica média e de aminoácidos de 73% entre elas. No entanto, observou uma grande diferença entre o peso molecular e um número considerável de substituições de aminoácidos entre estas duas esterases. Neste trabalho, a região sequenciada do fragmento gênico de *Z. indianus* é correspondente a 54% da extensão do éxon 1 do gene *Est-6* de *D. melanogaster* e apresenta similaridade nucleotídica média e de aminoácidos de 68% e 66%, respectivamente. Essas análises associadas à análise filogenética sugerem uma possível ortologia entre esses genes. Reforçando essa hipótese de ortologia, a sequência obtida para *Z. indianus* agrupa-se com aquelas de espécies pertencentes ao subgênero *Drosophila*, em concordância com o posicionamento filogenético das espécies do gênero *Zaprionus* aceito atualmente (TROCKMORTON, 1962, 1975; PELANDAKIS; SOLIGNAC, 1993; KWIATOWSKI et al., 1994; KWIATOWSKI; AYALA, 1999), como um clado mais próximo das espécies do grupo *repleta*.

A análise do polimorfismo do fragmento gênico de *Z. indianus* ortólogo ao do gene *Est-6* de *D. melanogaster* permitiu ainda inferir o tipo de seleção atuante nessa sequência, por meio da razão dN/dS estimado para linhagens ancestrais e invasoras. Os valores indicaram pressão seletiva purificadora atuando nas sequências de ambos os grupos de linhagens, dados que são concordantes com aqueles obtidos por Balakirev et al. (2006) na análise do *Est-6* em *D. melanogaster*, como também sugerido por Brady e Richmond (1992) com o gene ortólogo *Est-5B* em *D. pseudoobscura*.

As comparações entre as populações ancestrais e invasoras de *Z. indianus* realizadas no presente trabalho permitiram ampliar o conhecimento do processo de dispersão a partir de sua origem africana. As análises das sequências dos genes *COI* e *Est-6*, de 19 populações da África, Ásia e Américas confirmaram dados da literatura com relação a origem africana de *Z. indianus* (ANANINA et AL., 2007; DAVID et al., 2006ab; GALEGO; CARARETO, 2007), além de fornecer dados inéditos com relação à invasão no Brasil, pois indica a ocorrência de duas invasões distintas em nosso país, como também que a invasão da América do Norte se deu a partir de migrantes de

populações brasileiras. Estes dados são contrastantes com o cenário proposto por Machado (2005), David et al., (2006ab) e Galego e Carareto (2007) que sugeriram uma única invasão por meio de um propágulo único e numeroso.

A ampla distribuição de *Z. indianus*, que caracteriza essa espécie como a colonizadora mais bem sucedidas do gênero (CHASSAGNARD; TSACAS, 1993), dentro e em regiões de colonização mais antigas, como a Ásia, está diretamente relacionada ao hábito generalista desta espécie, ou seja, a capacidade de utilizar diversos recursos alimentares e de exibir adaptação em condições climáticas variáveis. Embora nossos dados indiquem que a colonização na América do Norte tenha ocorrido a partir do Brasil, a forma dessa invasão permanece desconhecida. Uma possibilidade é que essa dispersão tenha sido resultado da exportação de frutos brasileiros para a América do Norte, considerando que o Brasil é hoje o terceiro maior produtor mundial de frutas e exporta cerca de 14 culturas para os Estados Unidos. O estado da Flórida é um dos grandes centros de atividades comerciais e financeiras daquele país, com clima subtropical, o que explicaria a introdução de *Z. indianus* a partir de populações brasileiras, e o seu estabelecimento primeiramente nesse estado norte-americano.

7. CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

A análise do polimorfismo nucleotídico de um fragmento gênico de *Z. indianus* putativamente ortólogo ao gene *Est-6* de *D. melanogaster*, e do gene mitocondrial *COI*, em populações da África, Ásia, e das Américas do Sul e do Norte permitiu formular as seguintes conclusões:

- 1) As relações filogenéticas de *Z. indianus*, agrupando as sequências do gene *Est-6* com aquelas de espécies do subgênero *Drosophila*, dentro do gênero *Drosophila*, são concordantes com as atualmente propostas na literatura, e sugerem ortologia entre o fragmento gênico analisado e o gene *Est-6* *D. melanogaster*.
- 2) O nível de variação genética similar entre as populações ancestrais africanas e invasoras reforça a hipótese da origem africana de *Z. indianus*.
- 3) O gene *Est-6* em *Z. indianus* encontra-se sob seleção negativa nos dois grupos de populações investigadas, ancestrais (africanas) e invasoras (asiáticas e americanas).
- 4) As redes de haplótipos obtidas com as sequências dos genes *COI* e *Est-6* suportam a hipótese de origem africana dessa espécie. Além disso, esses marcadores sugeriram a ocorrência de duas invasões no Brasil, a partir da África, e que a invasão da América do Norte ocorreu a partir de populações brasileiras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANANINA, G.; ROHDE, C.; DAVID, J.R.; VALENTE, V.L.; KLACZKO, L.B. Inversion polymorphism and a new polytene chromosome map of *Zaprionus indianus* Gupta (1970)(Diptera: Drosophilidae). **Genet.**, (Epub ahead of print), 2007.
- ARARIPE, L.O.; KLACZKO, L.B.; MORETEAU, B.; DAVID, J.R. Male sterility thresholds, in a tropical cosmopolitan drosophilid, *Zaprionus indianus*. **J. Thermal Biol.**, v.29, n.2, p.73-80, 2004.
- AYALA, F.R.; SERRA, L.L.; PREVOSTI, A. A grand experiment in evolution: the *Drosophila subobscura* colonization of the America. **Genome**, v.31, p.246-255, 1989.
- BALAKIREV, E. S.; AYALA, F. J. Molecular population genetics of the β -esterase gene cluster of *Drosophila melanogaster*. **J. Genet.**, v.82, p.115–131, 2003.
- BALAKIREV, E. S.; ANISIMOVA, M.; AYALA, F. J. Positive and negative selection in the β -esterase gene cluster of the *Drosophila melanogaster* subgroup. **J. Mol. Evol.**, v. 62, p. 496-510, 2006.
- BRADY, J. P.; RICHMOND, R. C.; OAKESHOTT, J. G. Cloning of the esterase-5 locus from *Drosophila pseudoobscura* and comparison with its homologue in *D. melanogaster*. **Molec. Biol. and Evol.**, v. 7, p. 525-546, 1990.
- BRADY, J. P.; RICHMOND, R. C. Molecular analysis of evolutionary changes in the expression of *Drosophila* esterases. **Proc. Nat. Acad. Sci.** v. 87, p. 8217-8221, 1992.
- CASTRO, F.L.; VALENTE, V.L.S. *Zaprionus indianus* invading communities in the southern Brazilian city of Porto Alegre. **Dros. Inf. Serv.**, v.84, p.15-17, 2001.
- CHASSAGNARD, M. T.; TSACAS, L. Le sous-genre *Zaprionus* S, Str. Définition de groupes d'espèces et révision du sous-groupe vittiger (Diptera: Drosophilidae). **Annales de la Société Entomologique de France** v. 29, p. 173-194, 1993.
- DAVID, J.R.; CAPY, P. Genetic variation of *Drosophila melanogaster* natural populations. **Trends in genetics**, v.4, p.106-111, 1988.
- DAVID, J.R.; ARARIPE, L.O.; BITNER-MATHE, B.C.; CAPY, P.; GONI, B.; KLACZO, L.B.; LEGOUT, H.; MARTINS, M.B.; VOUIDIBIO, J.; YASSIN, A.; MORETEAU, B. Sexual dimorphism of body size and sternopleural bristle number: a comparison of geographic population of an invasive cosmopolitan drosophilid. **Genet.**, v.128, n.1-3, p.109-122, 2006a.
- DAVID, J.R.; ARARIPE, L.O.; BITNER-MATHE, B.C.; CAPY, P.; GONI, B.; KLACZO, L.B.; LEGOUT, H.; MARTINS, M.B.; VOUIDIBIO, J.; YASSIN, A.; MORETEAU, B. Quantitative trait analyses and geographic variability of natural

populations of *Zaprionus indianus*, a recent invader in Brazil. **Hered.**, v.96, n.1, p.53-62, 2006b.

DE SALLE, R. The phylogenetic relationships of flies in the family Drosophilidae deduced from mtDNA sequences. **Mol. Phyl. Evol.**, v.1, p.31-40, 1992.

FRITTS, T.H; RODDA, G.H. The role of introduced species in the degradation of island ecosystems: a case history of Guam. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** v.29, p.113-140, 1998.

GALEGO L. G; CERON C. R; CARARETO, C. M. Characterization of esterases in a Brazilian population of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). **Genet.**, v. 126, p. 89-99, 2006.

GALEGO L. G; CERON C. R; CARARETO, C. M. Analysis of the drosophilid *Zaprionus indianus* introduction in Brazil: contribution of esterase loci polymorphisms. **Dros. Inf. Serv.**, v.90, p.79-84, 2007.

GALEGO, L.G.; CERON, C.R.; CARARETO, C.M. Scenario for the spreading of the invasive species *Zaprionus indianus* Gupta 1970 (Diptera: Drosophilidae) throughout Brazil. **Genet Mol Biol** v.33, p.767-773, 2010.

GOÑI, B.; FRESIA, P.; CALVIÑO, M.; FERREIRO, M.J.; VALENTE, V.L.S.; BASSO DA SILVA, L. First record of *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae) in southern localities of Uruguay, South America. **Dros. Inf. Serv.**, v.84, p.61-65, 2001.

GOÑI, B.; MARTINEZ, M.E.; TECHERA, G.; FRESIA, P. Increased frequencies of *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae) in Uruguay. **Dros. Inf. Serv.**, v.85, p.75-80, 2002.

GRIMALDI, D.A. A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v.197, p.1-139, 1990.

HAMBLIN, M.T.; VEUILLE, M. Population structure among African and derived populations of *Drosophila simulans*: evidence for ancient subdivision and recent admixture. **Genet.**, v. 153, p.305-317, 1999.

HUEY, R.B.; GILCHRIST, G.W.; CARLSON, M.L.; BERRIGAN, D.; SERRA, L. Rapid evolution of a geographic cline in size in a introduced fly. **Science**, v.287, p.308-309, 2000.

KARAN, D.; MORIN, J. P.; GRAVOT, E.; MORETEAU, B.; DAVID, J. R. Body size reaction norms in *Drosophila melanogaster*: temporal stability and genetic architecture in a natural population. **Genet. Sel. Evol.** v. 31, p. 491-508, 1999.

- KATO, C.M.; FOUREAUX, L.V.; CÉSAR, R.A.; TORRES, M.P. Ocorrência de *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae) no estado de Minas Gerais. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v.28, n.2, p.454-455, 2004.
- KWIATOWSKI, J.; SKARECKY, D.; BAILEY, K.; AYALA, F.J. Phylogeny of *Drosophila* and related genera inferred from the nucleotide sequence of the Cu, Zn Sod gene. **J. Mol. Evol.**, v.38, p.443-454, 1994.
- KWIATOWSKI, J.; AYALA, F.J. Phylogeny of *Drosophila* and related genera: conflict between molecular and anatomical analyses. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.13, p.319-328, 1999.
- LINCOLN, R.; BOXSHALL, G.; CLARK, P. A dictionary of ecology, evolution and systematics. 2nd ed. Cambridge: **Cambridge University Press**, p.361, 1998.
- LOH, R.; BITNER-MATHE, B.C. Variability of wing size and shape in three populations of a recent Brazilian invader *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) from different habitats. **Genet.**, v.125, n.2-3, p.271-281, 2005.
- LODGE, D.M. Biological invasions: lessons for ecology. **Trends in ecology and evolution**, Oxford, v. 8, n.3, p. 133-137, march/1993
- MACHADO, T.; SOLÉ-CAVA, A.M.; DAVID, J.R.; BITNER-MATHÉ, B.C. Allozyme variability in an invasive drosophilid, *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae): comparison of a recently introduced Brazilian population with Old World populations. **Ann. Soc. Fr.**, v.41, p.7-13, 2005.
- MATA, R.M.; KANEGAE, M.F.; TIDON, R. .Diagnóstico ambiental do Parque estadual do Jalapão mediante a análise da fauna de Drosofilídeos (Insecta, Díptera). XXV Congresso Brasileiro de Zoologia, 2004. Abstract, <http://www.zoologia.bio.br/congressos/CBZ/resumos/XXVCBZcompleto-111.html> (April 5, 2009).
- MATTOS MACHADO, T.; SOLÉ-CAVA, A.; DAVID, J.R.; BITNER-MATHÉ, B.C. Allozyme variability in an invasive drosophilid, *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae): comparison of a recently introduced Brazilian population with Old World populations. **Annales de la Société Entomologique de France**, v.41, p.7-13, 2005.
- MORAES, E.M.; MATEUS, R.; SENE, F.M. Occurrence and fluctuation in population size of a recently introduced Drosophilidae species in Brazil. Abstract Book—XXI **International Congress of Entomology**, p. 271, 2000.
- NARDON, C.; DECELIÈRE, G.; LOVENBRUCK, C.; WEISS, M.; VIEIRA, C.; BIEMONT, C. Is genome size influenced by colonization of new environments in dipteran species? **Mol. Ecol.**, v.14, n.3, p.869-878, 2005.

PARKASH, R.; YADAV, J. P. Geographical clinal variation at seven esterase encoding loci in Indian populations of *Zaprionus indianus*. **Hereditas**, v. 119, p. 161-173, 1993.

PELANDAKIS, M.; SOLIGNAC, M. Molecular phylogeny of *Drosophila* based on ribosomal RNA sequences. **J. Mol. Evol.**, v.37, p.525–543, 1993.

PIMENTEL, D.; McNAIR, S.; JANEKA, J.; WIGHTMAN, J.; SIMMONDS, C.; O'CONNELL, C.; WONG, E.; RUSSEL, L.; ZERN, J.; AQUINO, T. TSOMONDO, T. Economic and environmental threats of alien plant, animal, and microbe invasions. **Agriculture Ecosystem environments**, v.84, p.1-20, 2001.

POWELL, J.R.; DE SALLE, R. *Drosophila* molecular phylogenies and their uses. In: Hecht, M.K. (Ed.), **Evolutionary Biology**. Plenum, New York, pp. 87–139, 1995.

REMSEN, J.; O'GRADY, P. Phylogeny of Drosophilinae (Diptera: Drosophilidae), with comments on combined analysis and character support. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.24, p.249–264, 2002.

RUIZ, G.M.; RAWLINGS, T.K.; DOBBS, F.C.; DRAKE, LK.A.; MULLADDY, T.; HUG, A.; COLWELL, R.R. Global spread of microorganisms by ships. **Nature**, London, v.408 (6808), p.49-50, 2000.

SANTOS, J.F.; RIEGER, T.T.; CAMPOS, S.R.C.; NASCIMENTO, A.C.C.; FELIX, P.T.; SILVA, S.V.O; FREITAS, F.M.R. Colonization of northeast region of Brazil by the drosophilid flies *Drosophila malerkotliana* e *Zaprionus indianus*, a new potential pest for Brazilian fruit culture. **Dros. Inf. Serv.**, v.86, p.92-95, 2003.

SAX, D.; GAINES, S. D. Species diversity: from global decreases to local increases. **Trends in Ecology and Evolution**. v.18, p. 561-566.

SERGEEV, P. V.; PANIN, V.M.; PALVLOVA, G.V.; KOPANTSEVA, M.R; SHOSTAK, N.G.; BASHKIROV, V.N.; GEORGIEV, G.P.; KOROCHKIN, L.I. The expression of esterase S gene of *Drosophila virilis* in *Drosophila melanogaster*. **FEBS Letters**, v. 360, p. 194-196, 1995.

SILVA, N.M.; FANTINEL, C.; VALENTE, V.L.S.; VALIATI, V.H. Population dynamics of the invasive species *Zaprionus indianus* (Gupta) (Diptera: drosophilidae) in communities of drosophilids of Porto Alegre city, southern of Brazil. **Neotropical Ent.**, v.34, n.3, p.363-374, 2005a.

SILVA, N.M.; FANTINEL, C.C; VALENTE, V.L.S.; VALIATI, V.H. Ecology of colonizing populations of the figfly *Zaprionus idnianus* (Diptera, Drosophilidae) in Porto Alegre, Southern Brazil. **Iheringia Sér. Zool**, v.95, p.233-240, 2005b.

STEIN, C. P. Mosca do figo *Zaprionus indianus*. IAC- Boletim eletrônico (<http://www.iac.br/~cenfit/artigos/zaprionus/index/htm>), 15/03/2000.

STEIN, C. P.; TEIXEIRA, E. P.; NOVO, J. P. S. Aspectos biológicos da mosca do figo, *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae). **Entomotropica** v. 8, p. 219–221, 2003.

TIDON, R.; LEITE, D.F.; LEÃO, B.F.D. Impact of the colonization of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) in different ecosystems of the neotropical region: 2 years after the invasion. **Biological conservation**, v.112, p.299-305, 2003.

TONI, D.C.; HOFMANN, P.R.P.; VALENTE, V.L.S. First register of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Biotemas**, v.14, p.71-85, 2001.

THROCKMORTON, L.H. Problem of Phylogeny in the Genus *Drosophila*. **Univ. Texas Publ.**, v.6205, p.207–344, 1962.

THROCKMORTON, L.H. The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila*. In: R.C. King, Editor, **Handbook of Genetics**, Plenum Press, New York, v.3, p.421–469, 1975.

TSACAS, L.; LACHAISE, D.; DAVID, J.R. Composition and biogeography of the Afrotropical drosophilid fauna. Ashburner, M., Carson, H. L., Thompson Jr., J. N. (Eds.), *The Genetics and Biology of Drosophila*, **Academic Press**, v. 3A. p. 197-200, 1981.

TSACAS, L.; CHASSAGNARD, M. T. Les espèces du genre *Zaprionus* à femurs antérieurs spinuleux (Diptera: Drosophilidae). **Ann. Soc. Entomol. Fr.**, v. 26, p. 461-487, 1990.

VAL, F.C.; SENE, F.M. A newly introduced *Drosophila* species in Brazil (Diptera: Drosophilidae). **Papéis avulsos do departamento de Zoologia da sociedade agrícola**, v.33, p.293-298, 1980.

VAN DER LINDEK, STECK, G. J.; HIBBARD, K. First records of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae), a pest species on commercial fruits from Panama and the United States of America. **Florida Entomologist**, v. 89, p. 402–404, 2006.

VEUILLE, M.; KING, M.L. Molecular Basis of Polymorphism at the Esterase-5B Locus in *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics Society of America**. v. 141, p. 255-262, 1995.

VILELA, C.R. Is *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae) currently colonizing the Neotropical region? **Dros. Inf. Serv.** 82: 37-39, 1999.

VILELA, C.R.; TEIXEIRA, E.P.; STEIN, C.P. Mosca africana do figo, *Zaprionus indianus* (Díptera: Drosophilidae). In: VILELA, E.; ZUCCHI, R.A.; CANTOR, F. (eds) **Histórico e impacto de pragas introduzidas no Brasil**. Editora Holos, São Paulo, p.48-52, 2000.

VILELA, C.R.; TEIXEIRA, E.P.; STEIN, C.P. Mosca-africana-do-figo, *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). In: Vilela E, Zucchi RA, Cantor F (eds) **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil**. Editora Holos, São Paulo, 48-52, 2001.

VOGL, C.; DAS, A.; BEAUMONT, M.; MOHANTY, S.; STEPHAN, W. Population subdivision and molecular sequences variation: theory and analyses of *Drosophila ananassae* data. **Genetics**, v.165, p.1385-1395, 2003.

YASSIN, A., CAPY, P., MADI-RAVAZZI, L., OGHEREAU, D., DAVID, J.R. DNA barcode discovers two cryptic species and two geographical radiations in the invasive drosophilid *Zaprionus indianus*. **Mol.Ecol.Notes**. v.8, p.491-501, 2008.