

JORGIANE BENEVENUTE PARISH

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E MORFOLÓGICA E ESPECIFICIDADE
HOSPEDEIRA DE MOSCAS MINADORAS EM CULTIVOS NO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P233i
2014 Parish, Jorgiane Benevenute, 1986-
Identificação molecular e morfológica e especificidade
hospedeira de moscas minadoras em cultivos no Brasil /
Jorgiane Benevenute Parish. – Viçosa, MG, 2014.
viii, 25f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Marcelo Coutinho Picanço.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Diptera. 2. Moscas minadoras. 3. *Liriomyza* spp.
4. Distribuição geográfica. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-graduação em
Fitotecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 595.77

JORGIANE BENEVENUTE PARISH

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E MORFOLÓGICA E ESPECIFICIDADE
HOSPEDEIRA DE MOSCAS MINADORAS EM CULTIVOS NO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de janeiro de 2014.

Gerson Adriano Silva

Júlio Cláudio Martins

Alberto Soares Côrrea

Marcelo Coutinho Picanço
(Orientador)

A Deus, a quem devo a vida, pelo amor e bênçãos concedidas.

Agradeço

Aos meus pais, Jorge e Vanda, por me preparar para a vida;

Aos meus irmãos, Sarah e Amós, pela amizade;

Ao meu esposo, Matt, pelo amor e companheirismo;

Aos meus familiares e amigos, pelo amor e carinho.

Dedico

Ao povo brasileiro e aos cientistas.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela vida, saúde, amor e por me acompanhar todos os dias no caminho do conhecimento.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao orientador e amigo, professor Marcelo Coutinho Picanço, pela amizade e confiança, pelos ensinamentos valiosos, pela paciência e pelo estímulo ao longo desses anos. À sua esposa Kátia e aos seus filhos Mayara, Luíza e Marcelo Filho, pelo agradável convívio.

Ao professor Alberto Corrêa Soares, pela co-orientação, ajuda e conselhos enriquecedores na realização deste trabalho.

Aos professores Gerson Adriano Silva e Júlio Cláudio Martins componentes da banca, pela cordialidade em aceitar o convite e pela forma como participaram.

Aos estagiários do laboratório de Manejo Integrado de Pragas: Elenir, Elizeu, Izaílda, João Rafael, Dalton, Mirian, Reginaldo, Tânia, Thiago e Júlia pela convivência maravilhosa e enriquecedora, e principalmente a Elenir pela grande e essencial ajuda na realização deste trabalho.

Aos amigos da pós-graduação do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas, Gerson, Vânia, Antônio, Tércisio, Ricardo, Renata, Rodrigo, Aelton, Paulo, Mayara e Tamiris pela grande amizade, convívio e companheirismo ao longo da minha vida acadêmica.

Aos meus amigos queridos Renata, Rodrigo, Paulo e Vânia pelos conselhos, pela ótima convivência e ajuda na condução deste trabalho. Obrigada pela ajuda nas coletas de campo, o auxílio de vocês foram fundamentais neste trabalho.

A Maria Dolores Alcazár Alba pela valiosa ajuda na identificação morfológica das amostras, sem a qual seria impossível a realização deste trabalho.

A Gislaíne Carvalho pela amizade e ajuda na identificação molecular dos insetos.

Ao professor Flávio Fernandes, pela coleta e fornecimento de adultos de mosca minadora, provenientes do Campus de Rio Paranaíba – UFV.

Aos parceiros Cesar Bate e Matheus Segantini, pela coleta e fornecimento de adultos de mosca minadora, provenientes de Pernambuco e São Paulo.

Aos estagiários, mestres e doutores que passaram pelo Laboratório de Manejo Integrado de Pragas: Adriano, Leandro Bacci, Darley, Elisa, Elisângela, Ézio, Emerson, Flávio, Hudson, Jander, Jardel, Júlio, Mateus Campos, Mateus Chediak, Renan, Rogério, Shaiene, Suzana, Vânia e Verônica;

A todos os colegas dos cursos de Fitotecnia e Agronomia pelo agradável convívio durante as disciplinas cursadas e pela relação de amizade e divergência de idéias que fazem da Universidade um ambiente propício à formação profissional e intelectual.

Aos professores da Universidade Federal de Viçosa, cuja orientação nas disciplinas me possibilitou a abertura de novos conhecimentos e horizontes científicos;

As secretárias do Programa de Pós graduação em Fitotecnia, Tatiani e Rafaela, pela competência e dedicação ao trabalho e ao funcionário Zé Evaristo pela amizade.

A todos os meus familiares, que diretamente ou indiretamente ofereceram condições para que eu progredisse na minha caminhada.

Aos meus irmãos, Sarah e Amós pelo apoio e amizade.

Ao Matt, meu grande amor, pela amizade, companheirismo, apoio, confiança e paciência demonstrada ao longo desse tempo de convivência.

Agradeço principalmente aos meus pais Jorge e Vanda que sempre acreditaram que o estudo é a maior herança que poderiam deixar aos seus filhos, algo que pode ser desfrutado por toda a vida.

Por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

JORGIANE BENEVENUTE PARISH, filha de Jorge Augusto Benevenute e Vanda Maria da Silva Benevenute, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, no dia 01 de setembro de 1986.

Em maio de 2006, ingressou no curso de Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em janeiro de 2012. Durante a graduação, de setembro de 2006 a fevereiro de 2012 foi estagiária no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas do Setor de Entomologia do DDE/UFV, sob a orientação do Professor Marcelo Coutinho Picanço. Neste período desenvolveu vários trabalhos na área de Manejo Integrado de Pragas em diversas culturas. Foi bolsista de Iniciação Científica pela FAPEMIG e PIBEX. Foi monitora da disciplina de Entomologia Agrícola por quatro semestres coordenado pelo Prof. Marcelo Coutinho Picanço.

Em março de 2012 ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em janeiro de 2014.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	4
2.1. Espécies, hospedeiros e distribuição geográfica das moscas minadoras	4
2.2. Influência do clima sobre as espécies de moscas minadoras	10
3. RESULTADOS	11
3.1. Espécies, hospedeiros e distribuição geográfica das moscas minadoras	11
3.2. Influência do clima sobre as espécies de moscas minadoras	15
4. DISCUSSÃO	17
5. CONCLUSÕES	20
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	21

RESUMO

PARISH, Jorgiane Benevenuto, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2014. **Identificação molecular e morfológica e especificidade hospedeira de moscas minadoras em cultivos no Brasil.** Orientador: Marcelo Coutinho Picanço.

As moscas minadoras (Diptera: Agromyzidae) são importantes pragas em cultivos de diversas plantas no mundo. Estes insetos causam danos a diversos hospedeiros por confeccionarem minas serpenteadas nas folhas, reduzindo área fotossintética e favorecendo a entrada de microrganismos fitopatogênicos nas plantas. Apesar da importância das moscas minadoras pouco se conhece sobre as espécies que ocorrem na região tropical. Assim, este trabalho teve como objetivo identificar morfológica e molecularmente, utilizando o gene citocromo c oxidase subunidade I, as espécies de mosca minadora de ocorrência em diferentes cultivos e regiões brasileiras. Foram coletados espécimes de mosca minadora nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e Pernambuco. Foram identificadas oito espécies de moscas minadoras: *Calycomyza malvae*, *Liriomyza brassicae*, *Liriomyza* sp. 1, *Liriomyza* sp. 2, *Liriomyza huidobrensis*, *Liriomyza sabaziae*, *Liriomyza sativae* e *Liriomyza trifolli* presentes no Brasil. De acordo com a análise dos componentes principais, as espécies *L.* sp. 2, *L. huidobrensis* e *L. brassicae* tenderam a ocorrer em locais de baixa ocorrência de chuvas. As espécies *L.* sp. 1, *L. sabaziae* e *L. trifolli* tenderam a ocorrer em locais de temperatura mais amena e de maior ocorrência de chuvas. A espécie *Calycomyza malvae* foi pouco influenciada pelos elementos climáticos.

ABSTRACT

PARISH, Jorgiane Benevenuto, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, January, 2014. **Molecular and morphological identification and host specificity of leafminer in crops in Brazil.** Adviser: Marcelo Coutinho Picanço.

The leafminers (Diptera: Agromyzidae) are important pests on crops of various plants in the world. These insects cause damage to several hosts to make serpentine mines on leaves, reducing photosynthetic area and favoring the entry of phytopathogenic microorganisms on plants. Despite the importance of leafminers little is known about the species that occur in tropical regions. This study aimed to identify morphologically and molecularly, using cytochrome c oxidase subunit I gene, leafminer species occurrence in different crops and regions. Leafminer specimens were collected in the states of Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia and Pernambuco. Eight species of leafminers were identified: *Calycomyza malvae*, *Liriomyza brassicae*, *Liriomyza* sp. 1, *Liriomyza* sp. 2, *Liriomyza huidobrensis*, *Liriomyza sabaziae*, *Liriomyza sativae* and *Liriomyza trifolli* present in Brazil. According to main component analysis, the species *L.* sp. 2, *L. huidobrensis* and *L. brassicae* tended to occur in areas of low rainfall. The species *L.* sp. 1, *L. sabaziae* and *L. trifolli* tended to occur in areas of milder temperatures and higher rainfall. The *Calycomyza malvae* specie was little influenced by climatic factors.

1. INTRODUÇÃO

As moscas minadoras (Diptera: Agromyzidae) são importantes pragas em cultivos de diversas plantas no mundo, sobretudo em solanáceas, cucurbitáceas, fabáceas e plantas ornamentais. A família Agromyzidae possui 15 gêneros dos quais o mais importante é o *Liriomyza* (Burgio et al. 2005, Nadagouda et al. 2010, Araújo et al. 2013). No mundo existem 376 espécies de *Liriomyza*, sendo que 23 destas são pragas em cultivos agrícolas. Dentre elas existem tanto espécies generalistas como especialistas (Spencer 1973, Parrella 1987).

Durante seu ciclo de vida as moscas minadoras passam pelos estádios de ovo, larva, pupa e adulto. Suas fêmeas perfuram a superfície foliar com o ovipositor confeccionando puncturas. A maioria destas puncturas é usada para alimentação dos adultos, sendo que eles alimentam do conteúdo celular extravasado neste processo. A outra parte destas puncturas é usada para inserção de ovos no mesófilo foliar. Ao eclodirem, as larvas confeccionam minas serpenteadas nas folhas. Estas larvas passam por três ínstaes. No final deste estágio as larvas saem das minas para empuparem nas folhas ou no solo. O ciclo de vida das moscas minadoras dura em média de 20 a 30 dias. Os ovos são endofíticos, difíceis de serem visualizados e eclodem de 2-5 dias de acordo com a temperatura. O estágio larval tem duração de 4-7 dias em temperaturas acima de 24 °C e é composto por três ínstaes. O período pupal pode variar de 8 a 11 dias dependendo da temperatura e a longevidade dos adultos varia entre 15 a 20 dias (Parrella 1983, Parrella 1987).

As puncturas causadas pelas fêmeas das moscas minadoras prejudicam a aparência das folhas e favorecem a entrada de fungos e bactérias

fitopatogênicos (Zitter et al. 1980; Parrella et al. 1985, Liu et al. 2009). No entanto, a principal injúria causada pelas moscas minadoras é a confecção de minas por meio da alimentação das larvas que destrói o mesófilo foliar, reduzindo a área fotossintética da planta e levando a queda das folhas.

A identificação das espécies de moscas minadoras pode ser feita tanto usando características morfológicas como por marcadores moleculares. Algumas espécies de moscas minadoras são morfológicamente semelhantes o que torna difícil a sua identificação morfológica, sendo necessário pessoal extremamente treinado para realização da atividade com precisão (Oudman et al. 1995, Chiu et al. 2000, Iwasaki et al. 2000, Morgan et al. 2000, Scheffer et al. 2001). A identificação morfológica das espécies de moscas minadoras é realizada pela análise da genitália dos machos adultos (Mazetti et al. 2006). Uma alternativa para a identificação destas espécies é o uso de marcadores moleculares, visto que ocorrem fracas variações fenotípicas entre algumas espécies, limitando o uso da identificação morfológica tradicional. Além disso, esta técnica pode ser útil quando a identificação pela genitália não for possível devido a exemplares danificados ou pela falta de pessoal treinado para a identificação (Corrêa et al., 2013).

Estudos filogenéticos utilizando dados de sequência de DNA indicaram que a sequência do citocromo oxidase I (COI) pode ser usada na identificação de espécies de moscas minadoras (Scheffer 2000, Scheffer 2005, Scheffer & Lewis 2005). O DNA *barcoding* é um método universal e permite determinar a diversidade biológica das espécies (Hebert et al. 2003, Hebert et al. 2004, Barrett & Hebert 2005). Essa técnica envolve a coleta de dados com base nas sequências de DNA de uma região de um único gene (geralmente uma peça de

688 pares de bases do citocromo-oxidase mitocondrial I (COI) das espécies de interesse (Scheffer et al. 2006).

Nakamura et al. (2012) descreveram um teste de PCR *multiplex*, resultando em padrões específicos para *Liriomyza bryoniae*, *L. chinensis*, *L. huidobrensis*, *L. sativae* e *Liriomyza trifolii*. De todas as abordagens desenvolvidas, o método de PCR *multiplex* é a técnica mais barata e rápida e, portanto adequada para utilização na identificação de rotina. Uma vez que se têm os *primers* desenvolvidos, a identificação precisa pode ser finalizada por meio da determinação do tamanho dos produtos de PCR utilizando eletroforese em gel de agarose.

Apesar da importância das moscas minadoras pouco se conhece sobre as espécies que ocorrem na região tropical. Na maioria dos trabalhos na região tropical não é realizada a identificação das espécies de maneira criteriosa. Nas regiões tropicais o relato das espécies de moscas minadoras é normalmente baseado na identificação de espécies no mesmo cultivo realizado nos países de clima temperado como se as espécies fossem as mesmas em diferentes regiões, com diferentes fatores bióticos e abióticos.

No planejamento de programas de manejo de pragas é importante a identificação correta destes organismos e o conhecimento dos fatores que regulam as suas populações (Tokumar et al. 2005). Entre os principais fatores que regulam as populações de insetos praga estão os elementos climáticos e a planta hospedeira. Elementos como a temperatura, chuvas, umidade relativa do ar, fotoperíodo, insolação e ventos influenciam grandemente as populações dos insetos praga afetando sua reprodução, sobrevivência, desenvolvimento e migração. Já a planta hospedeira também tem importante papel na regulação do tamanho das populações dos insetos praga devido as suas características

morfológicas, aleloquímicos e nutrientes (Wallner 1987). Dentro deste contexto se insere a situação de identificação das espécies de moscas minadoras nos cultivos no Brasil. Assim nossos objetivos foram: (1) identificar morfologicamente e molecularmente utilizando o gene citocromo c oxidase subunidade I as espécies de mosca minadora (Diptera: Agromyzidae) de ocorrência em diferentes cultivos agrícolas e regiões brasileiras; (2) avaliar quais os componentes bióticos e abióticos que influenciam na ocorrência das espécies de moscas minadoras nas regiões avaliadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Espécies, hospedeiros e distribuição geográfica das moscas minadoras

Os espécimes foram coletados nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro e São Paulo. Na Bahia as avaliações foram realizadas em Ibicoara. No Espírito Santo as avaliações foram realizadas em Venda Nova do Imigrante. Em Minas Gerais as avaliações foram realizadas em Araxá, Dionísio e Viçosa. Em Pernambuco as avaliações foram realizadas em Garanhuns. No Rio de Janeiro as avaliações foram realizadas em Paty do Alferes. Já em São Paulo as avaliações foram realizadas Ibiúna (Figura 1).

As culturas onde se realizou as coletas foram: alface e serralha (Asteraceae); brócolis, couve e repolho (Brassicaceae); abóbora e pepino (Cucurbitaceae); azaléia (Ericaceae); feijão comum, feijão vagem e soja (Fabaceae); quiabo (Malvaceae), tomate (Solanaceae) e pingo de ouro (verbanaceae) (Figura 1). Estas culturas foram avaliadas por elas estarem entre as principais espécies de plantas onde são relatados problemas com

moscas minadoras (Burgio et al. 2005, Nadagouda et al. 2010, Araújo et al. 2013). Também foram avaliadas as plantas daninhas existentes nos cultivos. Em cada cultivo foram coletadas 50 minas com larvas de mosca minadora.



Cidade, Estado	Coordenadas geográficas	Temperatura média (°C)	Chuvas totais (mm. ano ⁻¹)
1 Garanhus, PE	08°53'25"S 36°29'34"W	20,4	873
2 Ibicoara, BA	13°24'38"S 41°17'05"W	19,9	984
3 Dionísio, MG	19°50'34"S 42°46'36"W	22,9	1170
4 Venda Nova do Imigrante, ES	20°20'23"S 41° 08'05"W	19,8	1298
5 Araxá, MG	19°35'36"S 46°56'26"W	19,9	1643
6 Viçosa, MG	20°45'14"S 42°52'55"W	18,5	1315
7 Paty do Alferes, RJ	22°25'43"S 43°25'07"W	20,0	1637
8 Ibiúna, SP	23°39'23"S 47°13'21"W	17,4	1504

Figura 1. Mapa de localização e características dos locais de coleta dos espécimes de moscas minadoras (Diptera: Agromyzidae).

As folhas minadas coletadas em campo foram colocadas em sacola plástica transparente (2L) e levadas para laboratório. As folhas permaneceram na sacola plástica até a formação das pupas. As pupas formadas foram colocadas em pote plástico transparente (250 mL) até a emergência dos adultos. Os adultos emergidos foram divididos em dois grupos. Os insetos do primeiro grupo foram conservados em álcool 70% e eles foram usados na identificação das espécies por características morfológicas. Já os insetos do segundo grupo foram conservados em álcool 90% e eles foram usados na identificação das espécies por técnicas moleculares.

Os insetos destinados à identificação morfológica foram enviados ao Laboratório de Producción y Sanidad Vegetal em La Mojonera (Almeria), Espanha. A identificação das espécies foi realizada pela Dra. Maria Dolores Alcazár Alba. Os insetos foram dessecados e a genitália masculina foi usada na identificação das espécies de moscas minadoras (Lonsdale, 2011).

Para identificação das espécies de moscas minadoras por marcadores moleculares foi extraído o DNA dos espécimes e posteriormente foi realizada reação de polimerase em cadeia. A extração do DNA foi realizada a partir da maceração individual dos espécimes de moscas minadoras em 60 μ L de solução tampão de extração (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM e Triton X-100) contida em eppendorf de 1,5 mL. O macerado foi incubado por 30 minutos a 65 °C em banho ultratermostático (CT-281). Foi adicionado a cada eppendorf 25 μ g. mL⁻¹ de proteinase K (Sigma). O macerado foi incubado a 37°C por 30 minutos em banho ultratermostático (CT-281). Este material foi submetido a fervura por 10 minutos a temperatura de 100 °C em panela elétrica. O homogenado obtido foi armazenado a -20 °C em freezer (Bosch 310) para posteriores análises.

Para realização da reação de polimerase em cadeia (PCR) foi utilizado o método *multiplex*, onde cinco *primers* espécie-específicos e um *primer reverse* comum foram misturados para amplificar o DNA. As condições da reação de PCR foram desnaturação a 94 °C por um minuto, 32 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos. Os 12 µL da mistura de PCR consistia de 1µL do DNA, 1µL de cada um dos seis *primers* (5nM), 2,5mM de dNTP, 25mM de MgCl₂, 1 µL de DMSO (5%), 2 µL de tampão 5X e uma unidade de Taq polimerase. Os produtos de PCR foram analisados em gel agarose 2%. Os *primers* utilizados nesta pesquisa foram aqueles usados por Nakamura et al. (2012). As informações dos *primers* utilizados estão contidas na Tabela 1.

Para as amostras de alguns espécimes não foi possível amplificar o DNA das amostras pelo método *multiplex*. Assim para estas amostras foi utilizada a sequência parcial do gene mitocondrial COI com os seguintes *primers*: CI-J-1718, 5'- GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC-3'e TL2-N-3014, 5'- TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3' (Simon et al. 1994). Posteriormente as sequencias obtidas foram submetidas a conferência de homologia com sequências oriundas de outros indivíduos adicionados previamente no NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando a ferramenta BlastN. Para estas amostras as condições da reação de PCR foram desnaturação a 94 °C por um minuto, 30 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos. Os 25 µL da mistura de PCR consistia de 3 µL do DNA, 0,5 µM de cada *primer*, 2,5mM de dNTP, 2,5µL de tampão 10X e 1 unidade de Taq polimerase. Os produtos de PCR foram analisados em gel agarose 1%.

Tabela 1. Informações dos *primers* utilizados.

Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Ta (Tm) °C	Tamanho (pares de bases)	Espécies alvo
<i>Forward</i> CTAGGAATGATTTATGCAATG	55 (56)	649	<i>Liriomyza bryoniae</i>
<i>Forward</i> CATGACACTTATTATGTTGTTGCA	55 (61)	359	<i>Liriomyza chinensis</i>
<i>Forward</i> CAATCGGATCTTCAATTTCCCTTC	55 (67)	107	<i>Liriomyza huidobrensis/langei</i>
<i>Forward</i> TTATTGGTGTAATTTAACC	55 (51)	207	<i>Liriomyza sativae</i>
<i>Forward</i> TTATACACCAACTACTTTGTGAA	55 (56)	461	<i>Liriomyza trifolli-W</i>
<i>Reverse</i> GAATWGGRWAAATYACTTGACGTTG	55 (53)		Comum para <i>Liriomyza</i>

R = A ou G, Y = C ou T, W = A ou T; Ta – Temperatura de anelamento, Tm – Temperatura de *melting*, calculadas pelo método Nearest Neighbour,

2.2. Influência do clima sobre as espécies de moscas minadoras

Realizou-se análise de componentes principais (PCA) das espécies de moscas minadoras em função dos dados médios da insolação, temperatura média do ar, chuvas e umidade relativa. Os dados de insolação, temperatura média do ar, chuvas e umidade relativa correspondem a média dos locais de ocorrência das espécies durante o período de avaliação. Para realização da análise foi utilizado o programa Canoco 4.5 (Ter Braak, 1995). O PCA gera um gráfico de ordenadas “biplot”, no qual os gradientes de resposta foram representados por vetores com origem no ponto central dos eixos do diagrama de ordenação. Neste diagrama o comprimento do vetor é proporcional a importância da variável. As variáveis que apresentam correlação positiva possuem vetores com mesma direção e sentido. Já as variáveis com correlação negativa possuem vetores com mesma direção, mas sentido contrário. Quando o ângulo entre os vetores é de 90° as variáveis não são correlacionadas.

3. RESULTADOS

3.1. Espécies, hospedeiros e distribuição geográfica das moscas minadoras

A avaliação dos espécimes de moscas minadoras coletados no campo nos seis diferentes estados brasileiros resultou na análise de 136 indivíduos (Tabela 2). Foram identificadas oito espécies de moscas minadoras (Diptera: Agromyzidae). As espécies identificadas foram: *Calycomyza malvae* (Burgess), *Liriomyza brassicae* (Riley), *Liriomyza* sp. 1, *Liriomyza* sp. 2, *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard), *Liriomyza sabaziaae* Spencer, *Liriomyza sativae* Blanchard e *Liriomyza trifolli* (Burgess) (Tabela 2).

Liriomyza sp. 2 foi à espécie de mosca minadora com a maior distribuição geográfica sendo detectada em cinco estados brasileiros (Bahia, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro e São Paulo). Já as espécies *C. malvae* e *L. sabaziaae* foram as que apresentaram menor distribuição geográfica, pois foram detectadas somente no estado de Minas Gerais (Tabela 3).

L. sativae, *L. huidobrensis*, *L. sp. 1* e *L. sp. 2* foram às espécies de moscas minadoras observadas atacando o maior número de hospedeiros. Enquanto *L. sabaziaae* e *L. brassicae* foram às espécies observadas atacando o menor número de hospedeiros. Já *C. malvae* e *L. trifolli* foram observadas atacando um número de hospedeiros intermediário entre estes dois extremos (Tabela 3).

L. sativae foi observada atacando 11 espécies de plantas pertencentes a sete famílias (Asteraceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Ericaceae, Fabaceae, Malvaceae e Solanaceae). *L. huidobrensis* foi observada atacando oito espécies de plantas pertencentes a seis famílias (Asteraceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Solanaceae e Verbenaceae). *L. sp 2* foi observada

atacando seis espécies de plantas pertencentes a cinco famílias (Asteraceae, Brassicaceae, Fabaceae, Solanaceae e Verbenaceae) (Tabela 3).

Liriomyza sp. 1 foi observada atacando seis espécies de plantas pertencentes a três famílias (Brassicaceae, Cucurbitaceae e Fabaceae). *L. trifolli* foi observada atacando três espécies de plantas pertencentes a três famílias (Asteraceae, Brassicaceae e Fabaceae). *C. malvae* foi observada atacando duas espécies de plantas pertencentes a duas famílias (Cucurbitaceae e Fabaceae). *L. brassicae* foi observada atacando duas espécies de plantas pertencentes a família Brassicaceae. Já *L. sabaziae* só foi observada atacando uma espécie de planta pertencente a família Fabaceae (Tabela 3).

Tabela 2. Número de insetos identificados em seus respectivos locais de origem e hospedeiros.

Local	Coordenadas	Cultura	Espécies Identificadas								Número total
			C.m	L.ba	L.sp. 1	L.sp. 2	L.h	L.sb	L.st	L.t	
Guaranhus-PE	08°53'25"S 36°29'34"W	Tomate	0	0	0	2	0	0	0	0	2
Ibicoara - BA	13°24'38"S 41°17'05"W	Feijão	0	0	0	3	0	0	0	0	3
Venda Nova do Imigrante - ES	20°20'23"S 41°08'05"W	Tomate	0	0	0	0	0	0	4	0	4
Paty de Alferes- RJ	22°25'43"S 43°25'07"W	Couve	0	1	1	1	2	0	0	1	6
Paty de Alferes-RJ	22°25'43"S 43°25'07"W	Tomate	0	0	0	0	0	0	4	0	4
Ibiúna-SP	23°39'23"S 47°13'21"W	Alface	0	0	0	3	4	0	0	0	7
Araxá-MG	19°35'36"S 46°56'26"W	Pepino	0	0	0	0	4	0	1	0	5
Dionizio-MG	19°50'34"S 42°46'36"W	Couve	0	4	0	0	3	0	0	0	7
Viçosa-MG	20°45'14"S 42°52'55"W	Abobora	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Viçosa-MG	20°45'14"S 42°52'55"W	Alface	0	0	1	0	0	0	3	0	4
Viçosa-MG	20°45'14"S 42°52'55"W	Azaléia	0	0	0	0	0	0	6	0	6
Viçosa-MG	20°45'14"S 42°52'55"W	Brocolis	0	0	1	1	6	0	2	0	10
Viçosa-MG	20°45'14"S 42°52'55"W	Couve	0	0	9	0	3	0	11	0	23
Viçosa-MG	20°45'14"S 42°52'55"W	Feijão Comum	2	0	9	1	0	0	2	1	15
Viçosa-MG	20°45'14"S 42°52'55"W	Feijão Vagem	0	0	2	0	0	2	1	0	5
Viçosa-MG	20°45'14"S 42°52'55"W	Pepino	0	0	1	0	0	0	3	0	4
Viçosa-MG	20°45'14"S 42°52'55"W	Pingo de ouro	0	0	0	2	1	0	0	0	3
Viçosa-MG	20°45'14"S 42°52'55"W	Quiabo	0	0	0	0	0	0	2	0	2
Viçosa-MG	20°45'14"S 42°52'55"W	Repolho	0	5	1	0	9	0	3	0	18
Viçosa-MG	20°45'14"S 42°52'55"W	Seralha	0	0	0	0	0	0	2	1	3
Viçosa-MG	20°45'14"S 42°52'55"W	Soja	0	0	0	0	3	0	0	0	3
Viçosa-MG	20°45'14"S 42°52'55"W	Tomate	0	0	0	1	0	0	0	0	1

C.m = *Calycomyza malvae*; L.ba = *Liriomyza brassicae*; L. sp. 1 = *Liriomyza sp 1*; L. sp. 2 = *Liriomyza sp 2*; L.h = *Liriomyza huidobrensis*; L.sb = *Liriomyza sabaziae*; L.st = *Liriomyza sativae*; L.t = *Liriomyza trifolii*.

Tabela 3. Ocorrência de oito espécies de moscas minadoras (Diptera: Agromyzidae) em 14 espécies de plantas em seis estados do Brasil.

<u>Planta hospedeira</u>		<u>Estado do Brasil onde foi constatada a ocorrência de cada espécie de mosca minadora</u>							
<u>Família</u>	<u>Espécie</u>	<u><i>C. malvae</i></u>	<u><i>L. brassicae</i></u>	<u><i>L. sp. 1</i></u>	<u><i>L. sp. 2</i></u>	<u><i>L. huidobrensis</i></u>	<u><i>L. sabaziae</i></u>	<u><i>L. sativae</i></u>	<u><i>L. trifolii</i></u>
<u>Asteraceae</u>	<u>Alface</u>				<u>SP</u>	<u>SP</u>		<u>MG</u>	
	<u>Serralha</u>							<u>MG</u>	<u>MG</u>
<u>Brassicaceae</u>	<u>Brócolis</u>			<u>MG</u>	<u>MG</u>	<u>MG</u>		<u>MG</u>	
	<u>Couve</u>		<u>MG e RJ</u>	<u>MG e RJ</u>	<u>RJ</u>	<u>MG e RJ</u>		<u>MG</u>	<u>RJ</u>
	<u>Repolho</u>		<u>MG</u>	<u>MG</u>		<u>MG</u>		<u>MG</u>	
<u>Cucurbitaceae</u>	<u>Abóbora</u>	<u>MG</u>							
	<u>Pepino</u>			<u>MG</u>		<u>MG</u>		<u>MG</u>	
<u>Ericaceae</u>	<u>Azaléia</u>							<u>MG</u>	
<u>Fabaceae</u>	<u>Feijão comum</u>	<u>MG</u>		<u>MG</u>	<u>MG e BA</u>			<u>MG</u>	<u>MG</u>
	<u>Feijão vagem</u>			<u>MG</u>			<u>MG</u>	<u>MG</u>	
	<u>Soja</u>					<u>MG</u>			
<u>Malvaceae</u>	<u>Quiabo</u>							<u>MG</u>	
<u>Solanaceae</u>	<u>Tomate</u>				<u>MG e PE</u>	<u>MG</u>		<u>ES e RJ</u>	
<u>Verbenaceae</u>	<u>Pingo de ouro</u>				<u>MG</u>	<u>MG</u>			

3.2. Influência do clima sobre as espécies de moscas minadoras

Dos elementos climáticos dos locais de ocorrência das moscas minadoras apenas insolação, temperatura média do ar, chuvas e umidade relativa apresentaram correlações significativas ($p < 0,05$) com a ocorrência das espécies das espécies de moscas minadoras ao longo dos anos. O modelo de componentes principais (PCA) da ocorrência das espécies de moscas minadoras em função dos elementos climáticos gerou quatro eixos que explicaram 81,9% da variância. Entre as espécies de moscas minadoras a incidência de *C. malvae* foi pouco influenciada pelos elementos climáticos. O elemento climático, insolação teve baixo impacto sobre a incidência de moscas minadoras. As espécies *Liriomyza sp 2*, *L. huidobrensis* e *L. brassicae* tenderam a ocorrer em locais de baixa ocorrência de chuvas. Já *Liriomyza sp 1*, *L. sabaziae* e *L. trifolli* tenderam a ocorrer em locais de temperatura mais amena e de maior ocorrência de chuvas (Figura 2).

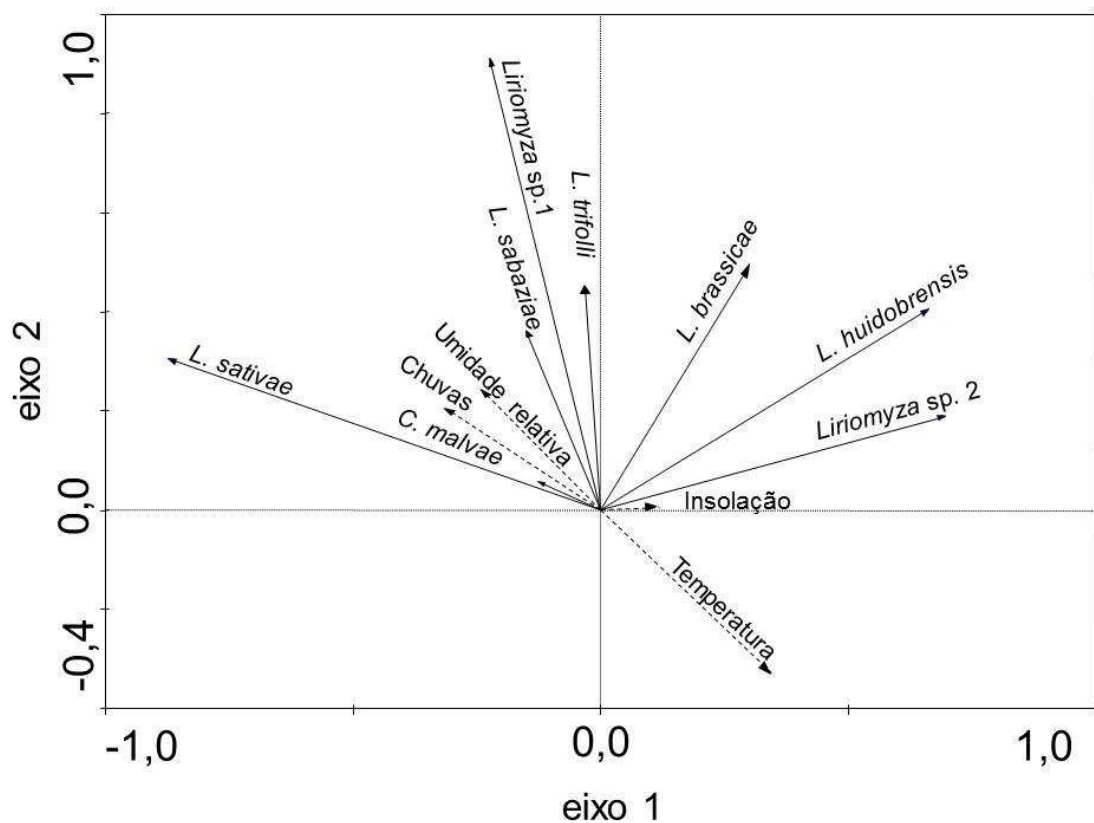


Figura 2. Diagrama da análise dos componentes principais (PCA) dos elementos climáticos e da ocorrência das espécies de moscas minadoras. O comprimento do vetor é proporcional à importância da variável. Variáveis com correlação positiva possuem vetores com mesma direção e sentido. Variáveis com correlação negativa possuem vetores com mesma direção e sentido contrário. Quando o ângulo entre os vetores é de 90° as variáveis não são correlacionadas.

4. DISCUSSÃO

Das oito espécies de moscas minadoras identificadas neste trabalho apenas seis haviam sido relatadas anteriormente no Brasil (Spencer 1973, 1990). Portanto este é o primeiro registro de duas novas espécies, *Liriomyza* sp. 1 e *Liriomyza* sp. 2, no Brasil. Este fato destaca a importância desta pesquisa como sendo uma das pioneiras na utilização conjunta de análises morfológicas e moleculares para a identificação correta das espécies de moscas minadoras presentes no Brasil.

O gene COI foi utilizado com sucesso para a identificação das espécies de moscas minadoras. Este gene já foi utilizado para identificação de espécies das ordens Diptera (Smith et al., 2007; Blacket et al., 2012), Hemiptera (Sufran & Puterka, 2011), Hymenoptera (Stewart et al., 2010) e Lepidoptera (Emery et al., 2011; Hrcsek et al., 2011). O gene COI também pode ser usado para identificação de outras espécies próximas cuja identificação baseada em aspectos morfológicos é de difícil execução (Herbert et al., 2004; Ellis et al., 2006; Smith et al., 2006; Koch, 2010).

A dificuldade da identificação morfológica se comprova com o fato de que existe uma longa história de confusão taxonômica em relação a *L. sativae*. A semelhança morfológica de *L. sativae* a outras espécies deste gênero causou inúmeras dificuldades de identificação na compreensão dos vários aspectos da biologia e ecologia desta espécie (Spencer 1973, Parrella, Parrella & Keil, 1984). *L. sativae* foi redescrita pelo menos sete vezes a partir de vários hospedeiros e locais (Spencer 1973).

Liriomyza sp. 1, *L.* sp. 2, *L. huidobrensis*, e *L. sativae* foram às espécies de moscas minadoras mais generalistas atacando a maior diversidade de hospedeiros. Por outro lado *L. sabaziae* e *L. brassicae* apresentaram um

número mais restrito de hospedeiros. Já *C. malvae* e *L. trifolli* foram observadas atacando um número de hospedeiros intermediário entre estes dois extremos. As espécies *L. sp. 1*, *L. huidobrensis*, *L. sativae* e *L. trifolli* são descritas como espécies generalistas atacando mais de 400 hospedeiros (Hondo et al. 2006, Lopez et al, 2010, Reitz & Trumble 2002, Parrella, 1987). Já as espécies *C. malvae*, *L. brassicae*, *L. sp. 2* e *L. sabaziae* são descritas como especialistas atacando um número restrito de hospedeiros (Chen et al. 2003, Santos et al., 2007, Spencer 1963).

As espécies de insetos herbívoros possuem exigências biológicas específicas. Dentre estas os elementos climáticos têm grande papel na determinação da ocorrência de insetos herbívoros nos diversos locais (Bale et al. 2002, Hopkins & Memmott 2003). Neste contexto a observação da ocorrência de *Liriomyza sp. 2*, *L. huidobrensis* e *L. brassicae* em locais mais secos e de *Liriomyza sp. 1*, *L. sabaziae* e *L. trifolli* em locais de temperatura mais amena e chuvosos indicam que estes elementos climáticos têm grande importância na determinação da ocorrência destas espécies. O principal impacto das chuvas sobre insetos minadores é a mortalidade que elas causam as larvas (Xavier, 2013). Já a temperatura geralmente é o elemento climático que mais influencia na biologia dos insetos atuando na sua reprodução, sobrevivência, desenvolvimento, crescimento, migração e comportamento dos insetos (Bale et al. 2002, Hopkins & Memmott 2003, Ray 2003, Ju et al. 2011).

Segundo Xavier (2013) há uma diminuição da duração dos estádios do ciclo de vida da *L. huidobrensis* em função do aumento da temperatura do ar o que indica que o desenvolvimento desse inseto pode ser acelerado em locais de cultivos onde as temperaturas são mais elevadas. Xavier (2013) demonstrou

que a temperatura ótima para a sobrevivência das larvas de *L. huidobrensis* foi de 28 °C.

Já o elemento climático chuvas, influencia negativamente as populações de moscas minadoras por causar o alagamento das minas levando a morte das larvas (Miranda et al. 1998, Pereira et al. 2007a e b). Xavier (2013) demonstrou que em períodos de intensa pluviosidade ocorrem as maiores mortalidades de larvas de 3º instar de *L. huidobrensis*.

Nas épocas e locais quentes deve-se voltar à atenção para o controle de larvas já que estas são favorecidas por elevadas temperaturas. Entre as práticas que podem ser usadas neste sentido está o uso de inseticidas larvicidas como avermectinas, espinosinas e triazinas (Mujica et al., 2000, Civelek & Weintraub 2003) e parasitóides larvais (Liu et al. 2009). Outra prática importante no controle das larvas da mosca minadora é adição de óleo na calda inseticida para aumentar a taxa de penetração do inseticida no interior das minas onde se encontram suas larvas (Guedes et al. 1995, Picanço et al. 1998).

5. CONCLUSÕES

Calycomyza malvae, *Liriomyza brassicae*, *Liriomyza* sp. 1, *Liriomyza* sp. 2, *Liriomyza huidobrensis*, *Liriomyza sabaziae*, *Liriomyza sativae* e *Liriomyza trifolli* são espécies de moscas minadoras presentes no Brasil.

Liriomyza sp. 2, *L. huidobrensis* e *L. brassicae* tendem a ocorrer em locais de baixa ocorrência de chuvas. Já a espécie *Liriomyza* sp. 1, *L. sabaziae* e *L. trifolli* tendem a ocorrer em locais de temperatura mais amena e de maior ocorrência de chuvas. A espécie *Calycomyza malvae* foi pouco influenciada pelos elementos climáticos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo, E. L., Nogueira, C. H. F., Netto, A. C. M., Bezerra, C. E. S. Biological aspects of the leafminer *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) on melon (*Cucumis melo* L.). **Ciência Rural**, v.43, p.579-582. 2013.
- Bale, J. S., Masters, G. J., Hodkinson, I. D., Awmack, C., Bezemer, T. M., Brown, V. K., Butterfield, J., Buse, A., Coulson, J.C., Farra J., Good, J.E.G., Harrington, R., Hartley S., Jones T.H., Lindroth, R.L., Press, M.,C., Symrnioudis, I., Watt, A.,D., Whittaker, J.,B. Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperatures on insect herbivores. **Global Change Biology**, v.8, p.1-16. 2002.
- Barrett, R. D. H., Hebert, P. D. N. Identifying spiders through DNA barcodes. **Canadian Journal of Zoology**, v.83, p.481–491. 2005.
- Blacket, M. J., Semeraro, L., Malipatil, M.,B. Barcoding Queensland Fruit Flies (*Bactrocera tryoni*): impediments and improvements. **Molecular Ecology Resources**, v.12, p.428–436. 2012.
- Burgio, G., Lanzoni, A., Masetti, A. & Manucci, F. Spatial Patterns and Sampling Plan for *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) and Related Parasitoids on Lettuce. **Environmental Entomology**, v.34, p.178-183. 2005.
- Civelek, P. G., Weintraub, P. G. Effects of bensultap on larval serpentine leafminers, *Liriomyza tirfolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae), in tomatoes. **Crop Protection**, v.22, p.479-483. 2003.
- Corrêa, A. S., Oliveira, L. O., Braga, L. S., Guedes, R. N. C. Distribution of the related weevil species *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* in Brazil. **Insect Science**, v.20, p.263-270. 2013.
- Chen, X. X., Lang, X. Y., Xu, Z. H., He, J. H. and Ma, Y. The occurrence of leafminers and their parasitoids on vegetables and weeds in Hangzhou area, Southeast China. **BioControl**, v. 48, p.515-527. 2003.
- Chiu, Y. C, Wu, W. J., Shiao, S. F., Shih, C.J. The application of RAPDPCR to develop rapid diagnostic technique for identification of 6 species of *Liriomyza* spp. (Diptera: Agromyzidae). **Chinese Journal of Entomology**, v.20, p.293–309. 2000.
- Ellis, J.S., Knight, M. E.; Carvell, C., Goulson, D. Cryptic species identification: a simple diagnostic tool for discriminating between two problematic bumblebee species. **Molecular Ecology Notes**, v.6, p.540-542. 2006.
- Emery, V.J., Landry, J.F., Eckert, C.G. Combining DNA barcoding and morphological analysis to identify specialist floral parasites (Lepidoptera: Coleophoridae: Momphinae: Mompha). **Molecular Ecology Resources**, v.9, p.217–222. 2009.

- Guedes, R. N. C., Picanço, M. C., Guedes, N. M. P., Madeira, N. R. Sinergismo do óleo mineral sobre a toxicidade de inseticidas para *Scrobipalpuloidea absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, p.313- 318. 1995.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., DeWaard, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B** v.270, p.313-321. 2003.
- Hebert, P. D. N.; Penton, E. H.; Burns, J. M.; Janzen, D. H.; Hallwachs, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.41, p.14812-14817. 2004.
- Hondo, T., Koike, A. & Sugimoto, T. Comparison of thermal tolerance of seven native species of parasitoids (Hymenoptera: Eulophidae) as biological control agents against *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) in Japan. **Applied Entomology and Zoology**, v.41, p.73-82. 2006.
- Hopkins, G. W., Memmott, J. Seasonality of a tropical leaf-mining moth: Leaf availability versus enemy-free space. **Ecological Entomology**, v.28, p.687- 693. 2003.
- Hrcek, J., Miller, S.E., Quicke, D.L.J., Smith, M.A. Molecular detection of trophic links in a complex insect host–parasitoid food web. **Molecular Ecology Resources**, v.11, p.786–794. 2011.
- Iwasaki, A., Kasugai, K., Iwaizumi R., Sasakawa, M. A newly recorded pest, *Liriomyza sativae* Blanchard in Japan. **Shokubutsu-Boeki**, v.54, p.142–147, 2000.
- Ju, R. T., Wang, F., Li, B. Effects of temperature on the development and population growth of the sycamore lace bug, *Corythucha ciliata*. **Journal of Insect Science**, v.11, p. 1-12. 2011.
- Koch, H. Combining morphology and DNA barcoding resolves the taxonomy of Western Malagasy *Liotrigona moure*, 1961 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **African Invertebrates**, v.51, p.413-421, 2010.
- Liu, T. X., Kang, L., Heinz, K. M., Trumble, J. Biological Control of *Liriomyza* leafminers: CAB reviews progress and perspective. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, **Nutrition and Natural Resources**, v.4, p.1-16. 2009.
- Lonsdale, O. The *Liriomyza* (Agromyzidae: Schizophora: Diptera) of California. **Zootaxa**, v.2850, p.1–123. 2011.
- Lopez, R., Carmona, D., Vincini, A. M., Monterubbianesi, G & Caldiz ,D. Population dynamics and damage caused by the leafminer *Liriomyza huidobrensis* Blanchard (Diptera: Agromyzidae), on seven potato

- processing varieties grown in temperate environment. **Neotropical Entomology**, v.39, p.108–114. 2010.
- Mazetti, A., Luchetti, A., Mantovani, B., Burgio, G. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assays to distinguish *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) from associated species on lettuce cropping systems in Italy. **Journal of Economic Entomology**, v.99, p.1268–1272. 2006.
- Miranda, M. M. M., Picanç, M. C., Zanuncio, J. C., Guedes, R. N. C. Ecological life table of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Biocontrol Science and Technology**, v.8, p.597-606. 1998.
- Morgan, D. J. W., Reitz, S. R., Atkinson, P. W., Trumble, J. T. The resolution of Californian populations of *Liriomyza huidobrensis* and *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) using PCR. **Heredity**, v.85, p.53–61, 2000.
- Mujica, N., Pravatiner, M., Cisneros, F. Effectiveness of abamectin and plant – oil mixtures on eggs and larvae of the leafminer fly, *Liriomyza huidobrensis* Blanchard. **CIP Program Report**, v. 2000, p.161-166. 2000.
- Nakamura, S., Masuda, T., Mochizuki, A., Konishi, K., Tokumaru, S., Ueno, K. and Yamaguchi, T. Primer design for identifying economically important *Liriomyza* species (Diptera: Agromyzidae) by multiplex PCR **Molecular Ecology Resources** doi: 10.1111/1755-0998.12025, 2012.
- Nadagouda, S. A., Patil, B. V., Venkateshalu & Sreenivas, A. G. Studies on crop loss estimation due to serpentine leaf miner, *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Agromyziidae: Diptera) on cotton. **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, v.23, p.107–108. 2010.
- Oudman, L., Aukema B., Menken, S. B. J., Ulenberg SA. A procedure for identification of polyphagous *Liriomyza* species using enzyme electrophoresis. **Bulletin OEPP/EPPO**, v.25, p.349–355. 1995.
- Parrella, M. P. Biology of *Liriomyza*. **Annual Review Entomology**, v.32, p.201–224. 1987.
- Parrella, M. P., Bethke, J. A. Biological studies of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) on Chrysanthemum, aster, and pea. **Journal of Economic Entomology**, v.77, p.342-345. 1984.
- Parrella, M. P., Robb, K. L., Bethke, J. A. Influence of selected host plants on the biology of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.76, p.112-115. 1983.
- Parrella, M. P., Jones, V. P., Youngman, R. R., Lebeck, L. M. Effect of leaf mining and leaf stippling of *Liriomyza* spp. on photosynthetic rates of chrysanthemum. **Annals of the Entomological Society of America**, v.78, p.90-93. 1985.

- Pereira E. J. G., Picanço M. C., Bacci, L., Lucia, T. M. C. D., Silva, E. M., Fernandes, F. L. Natural mortality factors of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) on *Coffea arabica*. **Biocontrol Science and Technology**, v.17, p.441-455. 2007a.
- Pereira E. J. G., Picanço, M. C., Bacci, L., Crespo A. L. B., Guedes, R. N. C. Seasonal mortality factors of the Coffee leafminer *Leucoptera coffeella*. **Bulletin of Entomological Research**, v.97, p.421-432. 2007b.
- Picanço, M., Leite, G. L. D., Guedes, R. N. C, Silva, E. A. Yield loss in trellised tomato affected by insecticidal sprays and plant spacing. **Crop Protection**, v.17, p.447-452. 1998.
- Ray, N., Currat, M., Excoffier, L. Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. **Molecular Biology and Evolution**, v.20, p.76-86. 2003.
- Reitz, S. R. & Trumble, J. T. Interspecific and intraspecific differences in two *Liriomyza* leafminer species in California. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.102, p.101-113. 2002.
- Santos, J.P., Redaelli, L. R., e Dal Soglio, F. K. Dípteros minadores e seus parasitóides em plantas de crescimento espontâneo em pomar orgânico de citros em Montenegro, RS, Brasil Iheringia, **Série Zoologia**, Porto Alegre, v.97, p.280-285, 2007.
- Scheffer, S. J. Invasive Diptera: using molecular markers to investigate cryptic species and the global spread of introduced flies. In: **The Evolutionary Biology of Flies** (eds Wiegmann BM, Yeates DK), Columbia University Press, New York, pp. 371–387, 2005.
- Scheffer, S.J., Lewis, M. L. Mitochondrial phylogeography of the vegetable pest *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae): divergent clades and invasive populations. **Annals of the Entomological Society of America**, v.98, p.181–186, 2005.
- Scheffer, S. J. Molecular evidence of cryptic species within *Liriomyza huidobrensis*. **Journal of Economic Entomology**, v93, p.1146–1151, 2000.
- Scheffer, M., Carpenter, S. R., Foley, J. A., Folke, C. and Walker, B. H. Catastrophic shifts in ecosystems. **Nature** 413:591–596, 2001.
- Scheffer, S. J., Matthew, L. L., Ravindra, C. J. DNA barcoding applied to invasive leafminers (Diptera: Agromyzidae) in the Philippines. **Annals of the Entomological Society of America**, v.99, p.204–210, 2006.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v.87, p.651–701, 1994.

- Shufran, K. A.; Puterka, G. J. DNA barcoding to identify all life stages of holocyclic cereal aphids (Hemiptera: Aphididae) on wheat and other Poaceae. **Annals of the Entomological Society of America** v.104, p.39-42, 2011.
- Smith, M. A.; Woodley, N. E.; Janzen, D. H.; Hallwachs, W., Hebert, P. D. N. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). **Proceedings of the National Academic of Sciences USA** v.103, p.3657-3662, 2006.
- Smith, M. A.; Woodley, N. E.; Janzen, D. H.; Hallwachs, W., Hebert, P. D. N. DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. **Proceedings of the National Academic of Sciences USA** v.104, p.4967-4972, 2007.
- Spencer, KA. Agromyzidae (Diptera) of economic importance. **Series Entomologica** 9. Dr W Junk, The Hague. pp. 418 1973.
- Spencer, K. A. Host specialization in the world Agromyzidae (Diptera). Series Entomologica 45. Kluwer **Academic Publishers, Dordrecht**. pp.444,1990.
- Spencer, K. A. A synopsis of the Neotropical Agromyzidae (Diptera). Transactions of the Royal Entomological Society of London. v.115, p.291-389, 1963.
- Stewart, L.C., Hale, R.J., Hale, M.L. Species-specific primers for the molecular identification of cryptic *Bombus* species in New Zealand. **Conservation Genetics**, v.11, p.1207–1209. 2010.
- Tokumaru, S., Kurita, H., Fukui, M., Abe, Y. Insecticide susceptibility of *Liriomyza sativae*, *L. trifolii*, and *L. bryoniae* (Diptera: Agromyzidae). Japanese **Journal of Applied Entomology and Zoology**, v.49, p.1–10, 2005.
- Wallner, W. E. Factors affecting insect population dynamics: differences between outbreak and non-outbreak species. **Annual Review Entomology** v.32, p.317-340, 1987.
- Xavier, V. M. Variação sazonal dos fatores de mortalidade natural e limiares térmicos para *Liriomyza huidobrensis*. Tese de Doutorado. **Universidade Federal de Viçosa**, 2013.
- Zitter, T. A., Tsai, J. H., Harris, Flies, K. F. In: Harris, K. F. & Maramorosch, K. eds. **Vectors of Plant Pathogens**. New York, USA, Academic Press. pp.165-176. 1980.