Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Análise morfométrica e molecular de morfotipos do complexo *fraterculus* (Diptera, Tephritidae, *Anastrepha*) de duas populações do Paraguai

Gleidyane Novais Lopes

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2010

Gleidyane Novais Lopes
Engenheiro Agrônomo

Análise morfométrica e molecular de morfotipos do complexo *fraterculus* (Diptera, Tephritidae, *Anastrepha*) de duas populações do Paraguai

Orientador:
Prof. Dr. **ROBERTO ANTONIO ZUCCHI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Lopes, Gleidyane Novais
Análise morfométrica e molecular de morfotipos do complexo *fraterculus* (Diptera, Tephritidae, *Anastrepha*) de duas populações do Paraguai / Gleidyane Novais Lopes. - - Piracicaba, 2010.
101 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Biomarcadores 2. Genética molecular 3. Morfometria 4. Mosca-das-frutas - Identificação - Paraguai I. Título

CDD 632.774
L864a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Com Amor

Dedico

Ao meu noivo, Fabio Mielezrski

Aos meus pais, Edmundo Lopes Bahia e Julia Novais Prates

Às minhas irmãs, Elane, Jucilane e Elisângela

&

À minha sobrinha, Lanna Sophya

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Toda minha gratidão e honra ao Eterno e Soberano Deus, pelos seus feitos inquestionáveis e por me dar força e sabedoria, para a concretização de mais uma etapa da minha vida;

Ao Prof. Dr. Roberto Antonio Zucchi por toda a orientação, ensinamentos, compreensão e confiança demonstrados ao longo desses anos de convivência;

Ao Prof. Dr. Fernando Luis Cônsoli pela orientação na área de genética molecular, sugestões, disponibilidade e ensinamentos;

Ao professor da Universidad Nacional de Assunción – Paraguai, M.Sc Osmar R. Arias, na pessoa de quem agradeço ao Serviço Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas (SENAVE), por conceder as amostras de moscas-das-frutas utilizadas neste estudo;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por ter me disponibilizado a bolsa de estudos;

À Dra. Marinéia Haddad e a M.Sc Lorena Nunes pelo auxílio nas análises e estudos estatísticos e disponibilidade em ajudar sempre que precisei;

Ao Prof. Dr. Elliot W. Kitajima e Dr. Francisco A.O. Tanaka pertencente ao Núcleo de Apoio a Microscopia Eletrônica da ESALQ/USP (NAP/MEPA) pelo auxílio na microscopia;

À Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' pela excelente estrutura disponibilizada para o desenvolvimento dos trabalhos;

Aos professores e servidores da ESALQ/USP pelos ensinamentos, competência e apoio, em especial a Regina Moraes, Maria Marta Barella e Carlos pela prontidão em ajudar sempre;

Aos colegas do Laboratório de Interações em Insetos, Aline Peruchi, Felipe Domingues, Fabio Dossi, Simone Prado, Tiago Zucchi, Priscila Fortes, Karina Albernaz agradeço a todos pela convivência, apoio e auxílio no laboratório, em especial agradeço a Aline Guidolin,

Karina Lucas e Guilherme Rossi pelo treinamento nos procedimentos práticos do estudo molecular e pelas dúvidas sanadas;

Às minhas amigas e parceiras do Laboratório de Taxonomia de Insetos, Zuzinaide, Amanda e Jaci, pelos bons momentos de trabalho, companheirismo, amizade e apoio;

Aos colegas Juliana Balbinotte, Aloisio Coelho Jr., Leandro Ribeiro, Maria Emilene, Daniel Chiaradia, Renata Morelli, Marcio Silva, Gerane Silva, Angelina Marcomini, Erika Pessoa, Rafael Pitta e Mônica pelos momentos de estudos, coletas de insetos, pela amizade, apoio e outros momentos de alegria compartilhados em Piracicaba;

A todos os colegas do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP pela amizade e convívio;

Por último, porém não menos importante agradeço à minha família e ao meu noivo Fabio Mielezrski pelo amor e apoio incondicional, que certamente me motivaram a perseverar neste trabalho.

Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu: há tempo de plantar e tempo de colher..."

Eclesiastes 3. 1

SUMÁRIO

RESUMO 11
ABSTRACT 13
LISTA DE FIGURAS 15
LISTA DE TABELAS 19
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS 21
1 INTRODUÇÃO 23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 25
2.1 *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) 25
2.2 Morfometria 26
2.3 Marcadores moleculares 28
3 MATERIAL E MÉTODOS 31
3.1 Obtenção de moscas-das-frutas 31
3.2 Identificação e caracterização morfológica de *Anastrepha fraterculus* complexo 32
3.3 Ilustrações 34
3.4 Estudos morfométricos 34
3.4.1 Espécimes 34
3.4.2 Acúleo 34
3.4.3 Asa 35
3.4.4 Análise dos dados morfométricos 37
3.4.4.1 Acúleo 37
3.4.4.2 Asa 37
3.5 Análises moleculares 38
3.5.1 Preparo do material 38
3.5.2 Extração de DNA 39
3.5.3 Marcadores moleculares 39
3.5.4 Sequenciamento do DNA 41
3.5.5 Alinhamento e análise dos dados moleculares 42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 43
4.1 Análises morfométricas com base nos acúleos 43

4.1.1 Análise discriminante **43**
4.1.2 Análise de Agrupamento **44**
4.1.3 Variação morfométrica do acúleo **47**
4.2 Análises morfométricas com base nas asas **51**
4.2.1 Análises das variáveis canônicas (AVC) **51**
4.2.2 Análise de agrupamento **56**
4.2.3 Centróide **61**
4.3 Análises moleculares **62**
4.3.1 Região do COI **62**
4.3.2 Região do ITS1 ..... **69**
5 CONCLUSÕES **73**
REFERÊNCIAS **75**
ANEXOS **83**

RESUMO

Análise morfométrica e molecular de morfotipos do complexo *fraterculus* (Diptera, Tephritidae, *Anastrepha*) de duas populações do Paraguai

A alta diversidade observada em *Anastrepha fraterculus* em toda sua área de distribuição caracteriza a existência do complexo *fraterculus*. A correta identificação de espécies de *Anastrepha* aparentadas atualmente exige a utilização de uma série de técnicas. Assim, o presente trabalho propõe verificar quão semelhantes os morfotipos de duas populações do complexo *A. fraterculus* são, usando dados morfológicos (morfometria tradicional e geométrica) e moleculares (marcadores nucleares e mitocondriais). As amostras de dois municípios do Paraguai (Concepción e Santa Rosa) foram analisadas e seis morfotipos (chamados de M1 a M6) foram reconhecidos (M1-M5 em Concepción; M1-M4 e M6 em Santa Rosa), com base nas variações do ápice do acúleo, e um morfotipo com o acúleo típico do complexo *fraterculus*. A análise multivariada das oito medidas tomadas a partir do acúleo indicaram diferenças entre todos os morfotipos. A análise morfométrica baseada na morfometria convencional também revelou a existência de variabilidade entre os morfotipos estudados, mas alguns espécimes do morfotipo M4 foram similares aos espécimes de morfotipos M5 e M3, em Concepción. As asas também foram submetidas à morfometria geométrica usando 20 marcos, que indicou a existência de variabilidade entre e dentro dos morfotipos. Morfotipos da população de Concepción tendem a formar grupos distintos. No entanto, além das variações morfológicas de morfotipos de ambas as populações analisadas, sequências parciais da citocromo oxidase I gene (Cox1) e região do espaçador interno transcrito 1 (ITS1) foram muito semelhantes entre si. Portanto, esses marcadores moleculares não diferenciaram os morfotipos estudados, os quais foram muito similares aos espécimes com o acúleo típico do complexo *fraterculus*.

Palavras-chave: Complexo *fraterculus*; Morfometria; COI; ITS1

ABSTRACT

Morphometric and molecular analysis of morphotypes of the *fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae, *Anastrepha*) of two populations from Paraguay

The high diversity observed in *Anastrepha fraterculus* throughout its distribution range characterizes the existence of the *fraterculus* complex. The correct identification of closely related species of *Anastrepha* currently requires the use of a number of techniques. Thus, the present work is proposed to verify how similar morphotypes of two populations of the *A. fraterculus* complex are, by using morphological (conventional and geometric morphometry) and molecular (nuclear and mitochondrial markers) data. Specimens from two municipalities of Paraguay (Concepción and Santa Rosa) were analyzed and six morphotypes (named from M1 to M6) were recognized (M1-M5 in Concepción; M1-M4 and M6 in Santa Rosa) based on variations in the apex of the aculeus, and a morphotype with the typical aculeus of the *fraterculus* complex. Multivariate analysis of eight measurements taken from the aculeus indicated differences among all morphotypes. Morphometric analysis based on conventional morphometry also revealed the existence of variability among the morphotypes studied, but some specimens from morphotype M4 were similar to specimens from morphotypes M5 and M3 in Concepción. Wings were also subjected to geometric morphometry by using 20 landmarks, which indicated the existence of variability between and within morphotypes. Morphotypes from the population of Concepcion tended to form separate groups. However, besides the morphological variations observed for morphotypes from both populations analyzed, partial sequences of the citochrome oxidase I (Cox1) gene and the internal transcribed spacer 1 (ITS1) region were highly similar among them. Therefore, these molecular markers did not differentiate the morphotypes studied and were highly similar to specimens with the aculeus shape typical of the *fraterculus* complex.

Keywords: *fraterculus* complex; Morphometry; COI; ITS1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Local de procedência das amostras de moscas-das-frutas (ARIAS, 2010)..... 31

Figura 2 - *Anastrepha fraterculus* complexo. A. Mesonoto sem faixas negras longitudinais; B. Faixa escura no mediotergito (b1) e no subescutelo (b2); C. Ápice do acúleo; D. Padão alar; célula bm hialina (d1); E. Espinhos da membrana eversível..... 33

Figura 3 - Ápice do acúleo de espécimes do complexo *fraterculus*. A. Morfotipo 1 (ápice do acúleo alongado e constrição definida); B. Morfotipo 2 (ápice não alongado e constrição definida); C. Morfotipo 3 (constrição definida e dentes mal-formados); D. Morfotipo 4 (constrição pouco definida e ápice robusto); E. Morfotipo 5 (constrição pouco definida e ápice não robusto); F. Morfotipo 6 (constrição pouco definida e dentes mal-formados); G. Acúleo típico de *Anastrepha fraterculus* complexo..... 33

Figura 4 - Medidas do ápice do acúleo de *Anastrepha fraterculus* complexo 35

Figura 5 - Marcos anatômicos e descrição das nervuras da asa do complexo *fraterculus*..... 36

Figura 6 - Representação do trecho do DNA mitocondrial onde se encontra o gene COI e localização aproximada dos iniciadores utilizados na amplificação do fragmento em estudo..... 40

Figura 7 - Organização do DNA ribossômico (DNAr) em *Ceratitis*, modificado de Douglas e Haymer (2001). Os blocos em cinza representam as regiões codificadoras, as linhas representam a região não-codificadora (ITS). Localização aproximada dos iniciadores utilizados neste trabalho..... 40

Figura 8 - Gráfico de dispersão de espécimes do complexo *fraterculus*, separados em morfotipos (M1-M5 e Af), do município de Concepción no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas a partir de oito medidas no acúleo..... 43

Figura 9 - Gráfico de dispersão de espécimes do complexo *fraterculus*, separados em morfotipos (M1-M4, M6 e Af), do município de Santa Rosa no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas a partir de oito medidas no acúleo..... 44

Figura 10 - Fenograma de espécimes do complexo *fraterculus*, separados em morfotipos (M1-M5 e Af), do município de Concepción, gerado a partir de oito medidas no acúleo..... 45

Figura 11 - Fenograma de espécimes do complexo *fraterculus*, separados em morfotipos (M1-M4, M6 e Af), do município de Santa Rosa, gerado a partir de oito medidas no acúleo..... 46

Figura 12 - Variação morfométrica do ápice do acúleo de espécimes do complexo *fraterculus*, separados em morfotipos (M1-M5 e Af), do município de Concepción..... 48

Figura 13 - Variação morfométrica do ápice do acúleo de espécimes do complexo *fraterculus*, separados em morfotipos (M1-M4, M6 e Af), do município de Santa Rosa..... 48

Figura 14 - Variação morfométrica do acúleo de espécimes do complexo *fraterculus*, separados em morfotipos (M1-M5 e Af), do município de Concepción..... 50

Figura 15 - Variação morfométrica do acúleo de espécimes do complexo *fraterculus*, separados em morfotipos (M1-M4, M6 e Af), do município de Santa Rosa..... 50

Figura 16 - Gráfico de dispersão de espécimes do complexo *fraterculus*, separados em morfotipos (M1-M5 e Af), do município de Concepción no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas após análise de coordenadas posicionais em plano cartesiano de 20 pontos anatômicos da asa. Os diagramas de conformações ao redor do gráfico indicam as conformações alares presumíveis para indivíduos situados no extremo superior e inferior das variáveis canônicas. As magnitudes das deformações foram aumentadas em 3X para visualização..... 54

Figura 17 - Gráfico de dispersão de espécimes do complexo *fraterculus*, separados em morfotipos (M1-M4, M6 e Af), do município de Santa Rosa no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas após análise de coordenadas posicionais em plano cartesiano de 20 pontos anatômicos da asa. Os diagramas de conformações ao redor do gráfico indicam as conformações alares presumíveis para indivíduos situados no extremo superior e inferior das variáveis canônicas. As magnitudes das deformações foram aumentadas em 3X para visualização..... 55

Figura 18 - Dendrograma para as variações morfológicas do complexo *fraterculus* do município de Concepción gerado por análise de *cluster* (UPGMA) a partir de distâncias de Mahalanobis apresentadas na Tabela 5..... 57

Figura 19 - Dendrograma para as variações morfológicas do complexo *fraterculus* do município de Santa Rosa gerado por análise de *cluster* (UPGMA) a partir de distâncias de Mahalanobis apresentadas na Tabela 6..... 58

Figura 20 - Dendrograma para as variações morfológicas do complexo *fraterculus* do município de Concepción gerado por análise de *cluster* (UPGMA) a partir de distância Euclidiana..... 59

Figura 21 - Dendrograma para as variações morfológicas do complexo *fraterculus* do município de Santa Rosa gerado por análise de *cluster* (UPGMA) a partir de distância Euclidiana..... 60

Figura 22 - Centróide para as variações morfológicas do complexo *fraterculus* do município de Concepción..... 61

Figura 23 - Centróide para as variações morfológicas do complexo *fraterculus* do município de Santa Rosa..... 62

Figura 24 Rede de haplótipos de DNA (COI) mostrando as inter-relações dos haplótipos dos morfotipos do complexo *fraterculus* no município de Concepción. Os pontos em cada traço representam a quantidade de mutações entre haplótipos e os valores indicam a posição em que a mutação ocorreu e qual base foi trocada. O tamanho e os números dentro do círculo indicam a quantidade de indivíduos que contêm cada haplótipo..... 65

Figura 25 Rede de haplótipos de DNA (COI) mostrando as inter-relações dos haplótipos dos morfotipos do complexo *fraterculus* no município de Santa Rosa. Os pontos em cada traço representam a quantidade de mutações entre haplótipos e os valores indicam a posição em que a mutação ocorreu e qual base foi trocada. O tamanho e os números dentro do círculo indicam a quantidade de indivíduos que contêm cada haplótipo..... 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Procedência dos espécimes, códigos utilizados nas análises morfométricas e morfotipos (denominados de M1-M6 e Af)..... 34
Tabela 2 - Procedência dos espécimes utilizados na análise da região do COI, códigos utilizados nas análises moleculares, morfotipos (M1-M6 e Af)..... 38
Tabela 3 - Procedência dos espécimes utilizados na análise da região do ITS1, códigos utilizados nas análises moleculares, morfotipos (M1-M6 e Af)..... 38
Tabela 4 - Oligonucleotídeos iniciadores usados nas reações de amplificação via PCR..... 40
Tabela 5 - Distâncias de Mahalanobis de variações morfológicas do complexo *fraterculus* do município de Concepción calculados a partir dos componentes de forma das asas..... 57
Tabela 6 - Distâncias de Mahalanobis de variações morfológicas do complexo *fraterculus* do município de Santa Rosa calculados a partir dos componentes de forma das asas..... 58
Tabela 7 - Composição nucleotídica média para as sequências da região do gene COI de espécimes do complexo *fraterculus*, do município de Concepción..... 63
Tabela 8 - Composição nucleotídica média para as sequências da região do gene COI de espécimes do complexo *fraterculus*, do município de Santa Rosa..... 63
Tabela 9 - Composição nucleotídica média para as sequências da região do gene COI de espécimes do complexo *fraterculus*, dos municípios de Concepción e Santa Rosa, de acordo com a posição do códon..... 63
Tabela 10 - Matriz de similaridade genética da porção COI dos morfotipos do complexo *fraterculus* do município de Concepción – Paraguai..... 67
Tabela 11 - Matriz de similaridade genética da porção COI dos morfotipos do complexo *fraterculus* do município de Santa Rosa – Paraguai..... 68
Tabela 12 - Matriz de similaridade genética da porção ITS1 dos espécimes do complexo *fraterculus*, do município de Concepción – Paraguai..... 71
Tabela 13 - Matriz de similaridade genética da porção ITS1 dos espécimes do complexo *fraterculus*, do município de Santa Rosa – Paraguai..... 72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Af	Acúleo típico do complexo *fraterculus*
C	Município de Concepción - Estado de Concepción – Paraguai
COI	Gene mitocondrial que codifica para a subunidade I da citocromo oxidase
ITS1	Gene *Internal Transcribed Spacer 1* do genoma nuclear
M1	Morfotipo1
M2	Morfotipo2
M3	Morfotipo3
M4	Morfotipo4
M5	Morfotipo5
SR	Município de Santa Rosa - Estado de Misiones - Paraguai

1 INTRODUÇÃO

As espécies de *Anastrepha* são separadas principalmente por detalhes do ápice do acúleo. Entretanto, algumas vezes os limites para sua separação não são bem definidos, o que faz necessária a utilização de outras técnicas para auxiliar a identificação.

Uma das mais importantes pragas desse gênero é *Anastrepha fraterculus*, a qual é originária da América do Sul e se encontra apenas no continente Americano, com distribuição desde o Sul dos E.U.A. até a Argentina, em regiões com clima tropical e subtropical (SALLES, 1995; STECK, 1999). No Brasil, está associada a 81 hospedeiros e foi registrada em 21 Estados (ZUCCHI, 2008).

Vários autores têm sugerido, com base em trabalhos sobre morfologia, citologia, bioquímica e genética molecular, que populações consideradas como *A. fraterculus* compreendem um complexo de espécies.

Um entendimento claro sobre a sistemática desse complexo é necessário para o sucesso da aplicação de medidas quarentenárias e de controle para proteção das culturas, uma vez que, o controle e os métodos de erradicação devem ser corretamente escolhidos para atender um alvo biológico e genético conhecido.

Dessa forma, com o emprego de técnicas morfométricas (morfometria tradicional e geométrica) e moleculares (marcadores nucleares e mitocondriais), se propõe caracterizar os morfotipos de duas populações do complexo *fraterculus*, coletadas nos minicípios de Concepción e Santa Rosa, no Paraguai.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830)

Um dos gupos de espécies de *Anastrepha*, que têm sido mais estudado, é o grupo *fraterculus* por reunir espécies-praga (WHITE; ELSON-HARRIS, 1992; ALUJA, 1994). Nesse grupo estão, entre outras espécies, *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835), *A. sororcula* Zucchi, 1979, *A. zenildae* Zucchi, 1979 e *A. turpiniae* Stone, 1942, que apresentam o ápice do acúleo semelhante ao de *A. fraterculus* (Wiedemann, 1830) (ZUCCHI et al., 1999). A primeira discussão detalhada da variação morfológica de *A. fraterculus* foi feita por Stone (1942), que estabeleceu três novas sinonímias e descreveu espécies bastante próximas da mosca-da-fruta-sulamericana. Populações dessas espécies, então denominadas como o complexo *A. fraterculus* [*sic*], ocorrem, desde o Vale do Rio Grande no sul no Texas até a Argentina (STONE, 1942). Zucchi (1981) estabeleceu mais três sinonímias, *A. costarukmanii* (Capoor, 1954) que se caracteriza por apresentar os dentes do ápice do acúleo mal formados e anormais, que considerou apenas como uma variação teratológica de *A. fraterculus*; e ainda *A. scholae* (Capoor, 1955) e *A. pseudofraterculus* (Capoor, 1955), cujo ovipositor é idêntico ao de *A. fraterculus*, apresentado pequenas variações, que foram consideradas como intraespecíficas.

Um dos problemas mais difíceis na taxonomia do gênero *Anastrepha* envolve uma de suas mais importantes e onipresentes espécies de praga, a mosca-da-fruta-sulamericana, *A. fraterculus*. Alguns dados (variação em isoenzimas, cariótipos, morfologia e *status* de praga em diferentes áreas) indicam que as populações agora consideradas como *A. fraterculus* compreendem mais de uma espécie críptica. Entretanto, não está claro exatamente quantas espécies podem estar envolvidas e se é possível delinear todas, por meio da morfologia, genética, distribuição, plantas hospedeiras ou comportamento (STECK, 1999).

Morgante et al. (1980), em um estudo isoenzimático do gênero *Anastrepha*, incluindo o grupo *fraterculus*, encontraram grande heterogeneidade genética intra e interpopulacional. Há várias espécies morfologicamente similares a *Anastrepha fraterculus*, o que pode ser um indicativo de que o grupo infragenérico *fraterculus* tenha uma história evolutiva recente (ALUJA, 1994; McPHERON et al., 1999; NORRBOM et al., 1999; SMITH-CALDAS et al., 2001). Atualmente, esse grupo reúne aproximadamente 30 espécies (NORRBOM et al., 1999). Um

grande volume de estudos tem evidenciado a heterogeneidade morfológica, biológica e genética de *A. fraterculus* ao longo da sua distribuição geográfica (STONE, 1942; STECK; SHEPPARD, 1993; AMARAL, 1994; SELIVON, 1996; SMITH-CALDAS et al., 2001; SOUZA et al., 2007).

Os caracteres morfológicos e moleculares adicionais precisam ser explorados para o melhor conhecimento das relações entre espécies pertencentes aos vários grupos de *Anastrepha* (McPHERON et al., 1999; NORRBOM et al., 1999). A tendência atual é aliar diversos métodos para obter identificações acuradas das espécies de *Anastrepha* taxonomicamente semelhantes (ARAUJO et al., 1998). *Anastrepha fraterculus* apresenta variações morfológicas e genéticas, formando um complexo de cariótipos (raças, ecótipos etc.), ou seja, os indivíduos compartilham ou não diversas características morfológicas e genéticas e, consequentemente, biológicas, ecológicas e comportamentais (SALLES, 2001).

Nenhuma espécie de *Anastrepha* recebeu tanta atenção como *A. fraterculus*, mas mesmo assim pouco se sabe ainda sobre suas variações intraespecíficas. A identificação de espécies crípticas é também fundamental para a correta interpretação das análises sistemáticas de nível superior. Apesar dos vários esforços para investigar a filogenia de *Anastrepha* utilizando métodos moleculares, ainda existem muitas questões sem respostas (McPHERON et al., 1999; BARR et al., 2005). Estudos de naturezas diversas têm proposto que *A. fraterculus* representa um grupo de espécies crípticas (SOLFERINE; MORGANTE, 1987; VERA; WILLINK, 2007).

Anastrepha fraterculus apresenta uma significativa variação morfológica entre as populações, descontinuidades genéticas na análise de isoenzimas e DNA, diferenças nos hospedeiros utilizados em diferentes regiões e diferentes cariótipos (SMITH-CALDAS et al., 2001; HERNÁNDEZ-ORTIZ et al., 2004; SELIVON et al., 2005). Os estudos entre populações da Argentina, não mostraram nenhuma evidência de comportamento de isolamento (PETIT-MARTY, 1999; PETIT-MARTY et al., 2004a) e também não encontraram evidencias de barreiras reprodutivas pós-zigóticas, tais como mortalidade diferencial de machos e esterilidade de híbridos (PETIT-MARTY et al., 2004b; SANTOS et al., 2001). Vera et al. (2006) analisaram a compatibilidade no acasalamento entre diversas populações de *A. fraterculus* da América do Sul e verificaram que algumas são isoladas reprodutivamente.

2.2 Morfometria

Durante muito tempo, o termo morfometria foi utilizado indiscriminadamente para qualquer estudo que analisava quantitativamente a variação da morfologia encontrada nos organismos. A palavra foi cunhada por Blackith (1965) para designar métodos para medir a distância de forma entre espécies e, a partir daí, construir fenogramas (MONTEIRO; REIS, 1999). Bookstein (1991) define morfometria como "o estudo estatístico da covariância entre mudanças de forma e fatores causais", ficando explícito que a morfometria estuda exatamente as causas das diferenças de forma entre organismos, sejam elas ecológicas ou filogenéticas (MONTEIRO; REIS, 1999).

Anastrepha fraterculus apresenta variabilidade morfológica considerável, por exemplo, no padrão alar, o que explica em parte o fato de ter sido descrita sob 10 nomes diferentes (STECK, 1999).

Alencar-Sousa (1998) caracterizou populações de *A. fraterculus*, *A. pickeli* Lima, 1934 e *A. zenildae* por meio da morfometria multivariada. As espécies generalistas (*A. fraterculus* e *A. zenildae*) apresentam populações morfologicamente semelhantes e a espécie especialista (*A. pickeli*) apresenta diferenciação bastante acentuada no tamanho das estruturas analisadas. Entretanto, esse autor comentou que as acentuadas diferenças em *A. pickeli* poderiam corresponder a duas supostas espécies.

As populações de *A. fraterculus* do México, Brasil, Colômbia e Argentina diferem estatisticamente tomando-se por base parâmetros do acúleo (comprimento do ápice, comprimento da serra e número de dentes da serra) e das asas (HERNANDEZ-ORTIZ et al., 2004). O grau de variação morfológica entre populações analisadas do México foi extremamente baixo, portanto podem ser consideradas, por meio da análise discriminante, como morfotipo distinto. Esses autores concluíram também que as populações do México e América Central são idênticas e sugeriram que ambas representam uma única espécie. Foi também claramente distinguível um grupo da Colômbia e outro de populações do Brasil e da Argentina. Esses resultados levaram à conclusão de que os morfotipos mexicano, andino e brasileiro podem ser reconhecidos eventualmente como três entidades taxonômicas distintas. Esses autores sugeriram também que as amostras de *A. fraterculus* mostraram não só uma grande diferenciação morfológica entre as populações, como também representam um complexo, o qual inclui diversos morfotipos.

Hernandez-Ortiz et al. (2010) analisaram 10 amostras de populações da Colômbia (2), Venezuela (5), Equador (1) e Peru (2) com 15 espécies por amostra. Foram avaliados 19

caracteres morfométricos para cada espécime, com base nas estruturas como o acúleo, mesonoto e asa. Os resultados mostraram que existem diferenças claras entre as populações, embora todas elas sejam da subregião biogeográfica do Noroeste da América do Sul. As amostras das montanhas da Colômbia e Venezuela foram muito similares umas às outras; um segundo grupo foi diferenciado a partir de uma única população das planícies venezuelanas; enquanto as amostras das terras baixas do Peru e Equador foram agrupadas separadamente

Araujo e Zucchi (2006) caracterizaram cinco espécies de *Anastrepha* do grupo *fraterculus* com base nas medidas do acúleo. Concluíram que os tamanhos do acúleo e do ápice de *A. fraterculus*, *A. obliqua*, *A. sororcula*, *A. zenildae* e *A. turpiniae* variam ao longo da distribuição da espécie e também entre os exemplares obtidos de uma mesma espécie de hospedeiro. Segundo aqueles autores, o formato do ápice do acúleo de *A. sororcula* e de *A. obliqua* são os mais distintos entre as cinco espécies estudadas. *A. fraterculus*, *A. zenildae* e *A. turpiniae* possuem os formatos do ápice do acúleo mais semelhantes, entretanto, essas espécies podem ser separadas por análise discriminante baseada em oito medidas do acúleo (ARAUJO et al., 1998).

2.3 Marcadores moleculares

A biologia molecular tem revolucionado os estudos de sistemática por esclarecer muitos problemas considerados sem solução com base na morfologia. Em todas as espécies, o grande número de genes de funções bioquímicas diversas possibilita que sejam sequenciados, alinhados e analisados para estudos das relações filogenéticas, além de permitir o esclarecimento das relações entre as espécies indistinguíveis. Assim, nos últimos anos, entomologistas têm utilizado essa tecnologia com novos níveis de resolução, não somente para estudos de sistemas ecológicos em insetos, mas nas diversas áreas da biologia, pura e aplicada, abrangendo também questões como filogenia, evolução, ecologia e dinâmica populacional (HILLIS; DIXON, 1991; LOXDALE; LUSHAI, 1998).

Há várias técnicas moleculares disponíveis para o exame da variabilidade genética por meio da análise de proteínas, RNA e DNA, tanto mitocondrial quanto nuclear. Elas variam em relação à dificuldade técnica, ao nível de variabilidade genética que pode ser detectado, aos custos e tempo envolvidos (SILVA, 2000). Os marcadores moleculares são amplamente empregados, entre os quais, estão isoenzimas, microssatélites de DNA, DNA mitocondrial e os

espaçadores do DNA ribossômico, ITS e NTS (HILLS; DIXON, 1991; HILLS; MORITZ; MABLE, 1996; RODERICK, 1996).

Em termos de biologia molecular, a investigação de uma espécie complexa (p.ex. *A. fraterculus*), tem recebido mais atenção do que outras áreas de sistemática de *Anastrepha*. Isso é compreensível, uma vez que *A. fraterculus* é uma séria praga agrícola e a variação morfológica intraespecífica foi relativamente alta em comparação às outras espécies de *Anastrepha* investigadas na década de 1980 e início de 1990 (SILVA; BARR, 2006). Os marcadores moleculares mais sensíveis que podem ser os mais adequados para o reconhecimento de espécies utilizando sequências de DNA (SMITH-CALDAS et al., 2001) e microssatélites (FRITZ; SCHABLE, 2004) têm se tornado "rotina" apenas nos últimos cinco a dez anos (SILVA; BARR, 2006).

Selivon et al. (2005) caracterizaram três espécies crípticas do complexo *fraterculus* por meio de análise de isoenzimas, cariotipagem e compatibilidade de cruzamento, analisando 10 populações. Também foram encontradas diferenças morfológicas nos ovos desses três táxons (SELIVON; PERONDINI, 2007). Prezotto (2008) analisou o espaçador ITS1 do DNA ribossômico das espécies do complexo *fraterculus* do Brasil e de outras regiões da América do Sul, Central e México, e também observou que há claramente três táxons do complexo no Brasil, enfatizando que morfotipos devem existir nas diferentes regiões da América Latina.

Steck (1991) estudou quatro espécies de *Anastrepha* (*A. distincta*, *A. fraterculus*, *A. obliqua* e *A. striata*), centrando-se em oito populações geográficas de *A. fraterculus* e vários hospedeiros na América do Sul e Central. Seus resultados mostraram alta variabilidade genética (com base em isoenzimas) dentro de *A. fraterculus*. Dividiu as populações em dois grupos, o primeiro incluindo populações do nordeste do Brasil (Bahia), Venezuela (litoral), Costa Rica e México; e o segundo formado por populações do sudeste do Brasil (São Paulo), Venezuela Andina e Peru. De acordo com esse estudo, o complexo *A. fraterculus* não é monofilético.

Outra técnica que tem sido utilizada no estudo da variabilidade genética do complexo *A. fraterculus* é chamada polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) do DNA. Esse método tem sido particularmente útil quando aplicado ao DNA mitocondrial devido à elevada taxa de substituição presente no genoma (SIMON et al., 1994; RODERICK, 1996). Steck e Sheppard (1993) utilizaram a PCR-RFLP na análise de diferentes populações de *A. fraterculus*

do Brasil (SP e BA) e Venezuela (Los Caracas, área costeira e Mérida, Andes), observando polimorfismo elevado e pouco ou nenhum fluxo gênico.

Santos e Matioli (1997) também estudaram duas populações geográficas de *A. fraterculus* no Brasil via RFLP de DNA mitocondrial e nuclear, indicando que as mesmas representariam espécies do complexo *fraterculus*.

Em trabalhos realizados por Alberti et al. (2002, 2008), com base em oito locos isoenzimáticos e padrões de restrição de fragmentos do gene 16S do DNA ribossômico e do gene mitocondrial COII, com populações de *A. fraterculus* da Argentina e sul do Brasil, foi demonstrado que as populações argentinas e de Pelotas (Brasil), pertencem a uma única espécie.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de moscas-das-frutas

As moscas-das-frutas, do complexo *fraterculus*, foram coletadas pelos técnicos do SENAVE (Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas) – Paraguai, que estão desenvolvendo o programa "Moscas de las Frutas". Os espécimes foram coletados em armadilha tipo McPhail nos municípios de Concepción, (Estado de Concepción) e Santa Rosa (Estado de Misiones) (Figura 1) e fixados em etanol 70%.

Figura 1 - Local de procedência das amostras de moscas-das-frutas (ARIAS, 2010)

3.2 Identificação e caracterização morfológica de *Anastrepha fraterculus* complexo

A identificação taxonômica foi realizada com o auxílio de microscópio estereoscópico, baseada nos caracteres morfológicos das fêmeas, como padrão alar, padrão torácico, mediotergito, subescutelo e, principalmente, no exame ventral do ápice do acúleo, utilizando-se chaves de identificação (CANAL DAZA, 1997; ZUCCHI, 2000).

Anastrepha fraterculus (Wied.) caracteriza-se pelo ápice do acúleo denteado, com distinta constrição antes da serra, com dentes arredondados no mínimo até a metade apical (Figura 2C). As variações morfológicas deste estudo são semelhantes à espécie nominal *A. fraterculus* quanto ao mesonoto sem faixas negras longitudinais (Figura 2A), mediotergito e subescutelo escurecidos lateralmente (Figura 2B), faixas alares marrom-claras e/ou amareladas (Figura 2D) e espinhos da membrana eversível (não examinado em todos os exemplares) (Figura 2E) (ZUCCHI, 2000). Entretanto, apresentam variações no ápice do acúleo, o que possibilitou a separação dos morfotipos (Figura 3).

As variações morfológicas ou morfotipos (denominados M1 a M6), do complexo foram assim caracterizados: M1: ápice do acúleo alongado e constrição definida; M2: ápice não alongado e constrição definida; M3: constrição definida e dentes mal-formados; M4: constrição pouco definida e ápice robusto; M5: constrição pouco definida e ápice não robusto; M6: constrição pouco definida e dentes mal-formados e Af: acúleo típico do complexo *fraterculus*. O morfotipo M5 foi coletado em Concepción e o M6 em Santa Rosa; os demais ocorreram nos dois municípios (Figuras 3A - G).

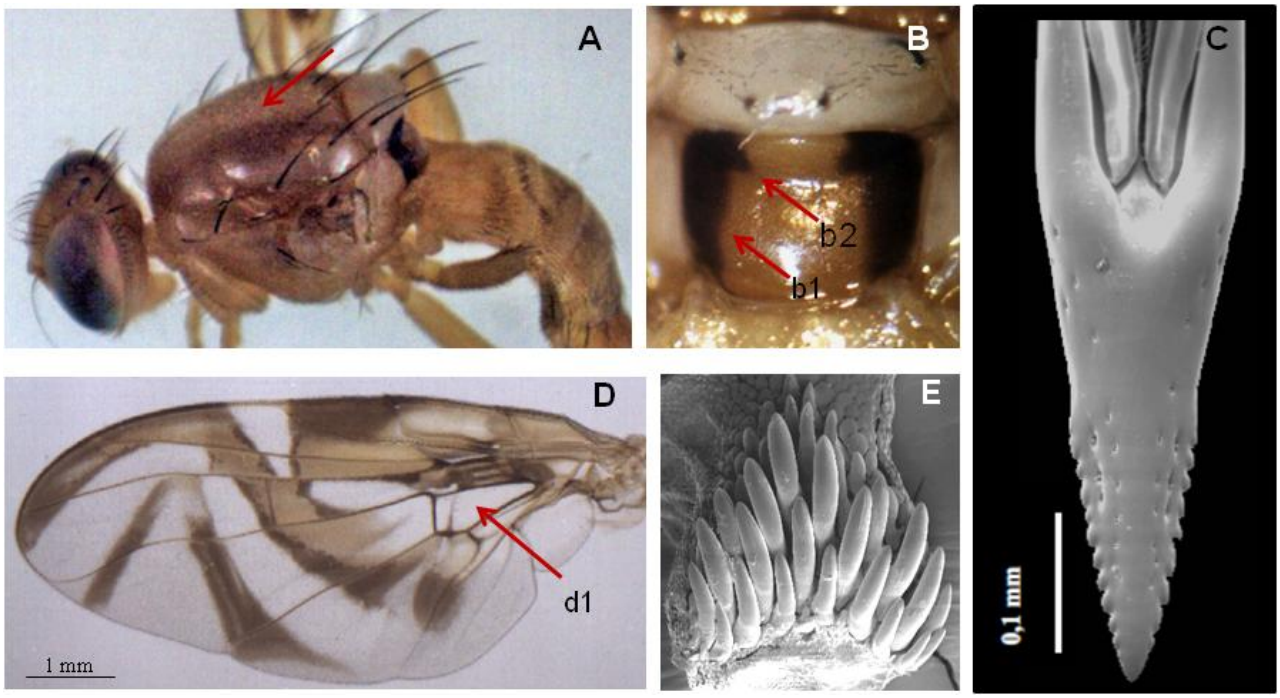


Figura 2 – *Anastrepha fraterculus* complexo. A. Mesonoto sem faixas negras longitudinais; B. Faixa escura no mediotergito (b1) e no subescutelo (b2); C. Ápice do acúleo; D. Padrão alar; célula bm hialina (d1); E. Espinhos da membrana eversível

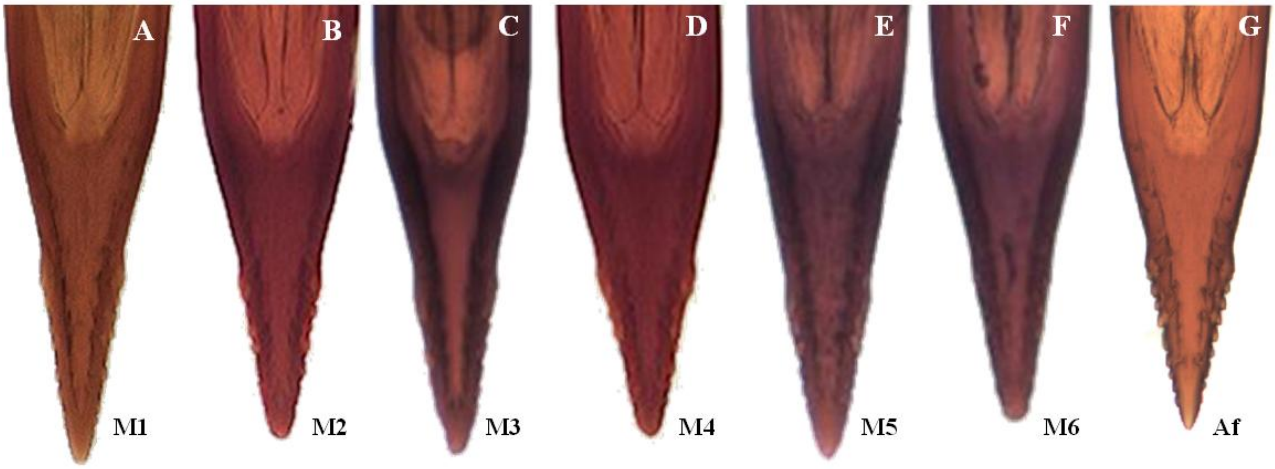


Figura 3 – Ápice do acúleo de espécimes do complexo *fraterculus*. A. Morfotipo 1 (ápice do acúleo alongado e constrição definida); B. Morfotipo 2 (ápice não alongado e constrição definida); C. Morfotipo 3 (constrição definida e dentes mal-formados); D. Morfotipo 4 (constrição pouco definida e ápice robusto); E. Morfotipo 5 (constrição pouco definida e ápice não robusto); F. Morfotipo 6 (constrição pouco definida e dentes mal-formados); G. Acúleo típico de *Anastrepha fraterculus* complexo

3.3 Ilustrações

O acúleo foi montado em base apropriada de alumínio (*stubs)* por meio de fita adesiva dupla face. Essa estrutura foi recoberta com uma fina camada de ouro no metalizador e examinado ao microscópio eletrônico de varredura (Zeiss – DSM 940A e LEO 435VP) do Núcleo de Apoio à Pesquisa, Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) – ESALQ/USP. As imagens das asas e demais acúleos foram obtidas pelo sistema de imagens da câmera Motic Image Plus 2.0®, acoplada ao microscópio de luz.

3.4 Estudos morfométricos

3.4.1 Espécimes

Foram selecionados, quando possível, 10 espécimes de cada morfotipo para tomada de medidas do acúleo (morfometria convencional) e das asas (morfometria geométrica). Foram analisados 62 espécimes de Concepción e 56 de Missiones, distribuídos nas cinco variações morfológicas para cada município, incluindo os exemplares típicos de *A. fraterculus* complexo (Tabela 1). Os espécimes-testemunha estão depositados na coleção do Departamento de Entomologia e Acarologia (ESALQ/USP), Piracicaba, SP.

Tabela 1 - Procedência dos espécimes, códigos utilizados nas análises morfométricas e morfotipos (denominados de M1-M6 e Af)

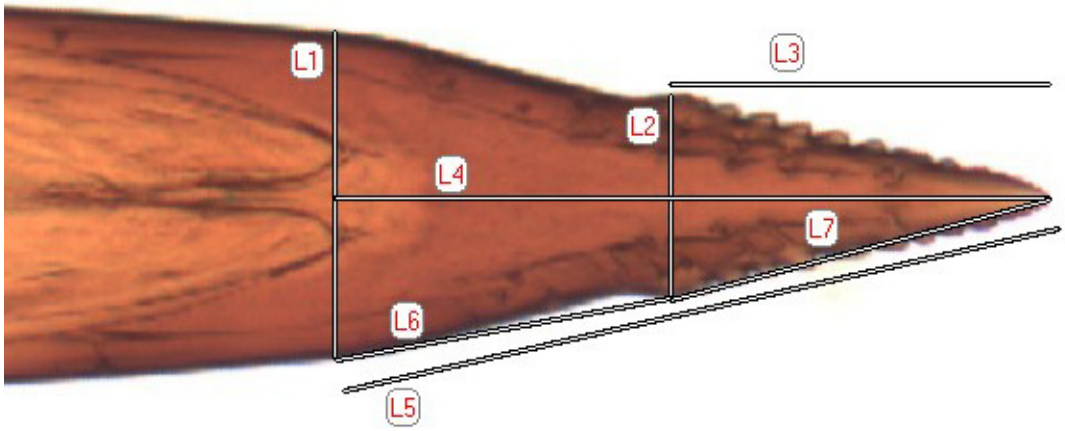
Estado	**Município - Códigos**	**M1**	**M2**	**M3**	**M4**	**M5**	**M6**	**Af**	**Total**
Concepción	Concepción - C	11	14	11	10	5	-	11	62
Misiones	Santa Rosa - SR	11	11	10	2	-	10	12	56
Total									**118**

3.4.2 Acúleo

A fêmea foi colocada em posição ventral em placa de Petri sob microscópio estereoscópico, para que o acúleo fosse extrovertido com auxílio de uma pinça e um estilete,

distendendo-se também a membrana eversível. O acúleo foi montado em glicerina, em posição ventral sobre lâmina microscópica, e coberto com lamínula.

Os estudos morfométricos foram elaborados em imagens digitalizadas obtidas pelo sistema de imagens da câmera Motic Image Plus 2.0®, acoplada a um microscópio de luz para as medidas do acúleo (Figura 4), usando-se o "*software*" Motic Images Advanced 3.2®.



MEDIDAS	DESCRIÇÃO
L1	Largura do acúleo ao nível da abertura da cloaca
L2	Largura do acúleo no início da serra
L3	Comprimento da serra
L4	Comprimento do ápice do acúleo a partir da abertura da cloaca
L5	Comprimento da margem do ápice do acúleo
L6	Comprimento da margem do ápice do acúleo, da abertura da cloaca até o início da serra
L7	Comprimento da margem do ápice do acúleo, do início da serra até o ápice
L8	Comprimento total do acúleo

Figura 4 – Medidas do ápice do acúleo de *Anastrepha fraterculus* complexo

3.4.3 Asa

A asa esquerda foi retirada e distendida em lâmina de microscopia, coberta com glicerina, e sobreposta por uma lâmina milimetrada. As imagens foram obtidas e digitalizadas por meio de câmera Motic Image Plus 2.0®, acoplada a um microscópio de luz. Na sequência, com o auxílio do "*software*" TpsUtil versão 1.38 (ROHLF, 2006), foi construído um arquivo que permitiu a análise das imagens capturadas. Posteriormente, os 20 marcos anatômicos homólogos foram digitalizados utilizando-se o "*software*" TpsDig versão 1.40 (ROHLF, 2004), que permitiu digitalizar os marcos anatômicos homólogos, de cada exemplar, transformando-os em

coordenadas cartesianas (x e y). A descrição dos marcos anatômicos (pontos homólogos) está disponível na Figura 5.

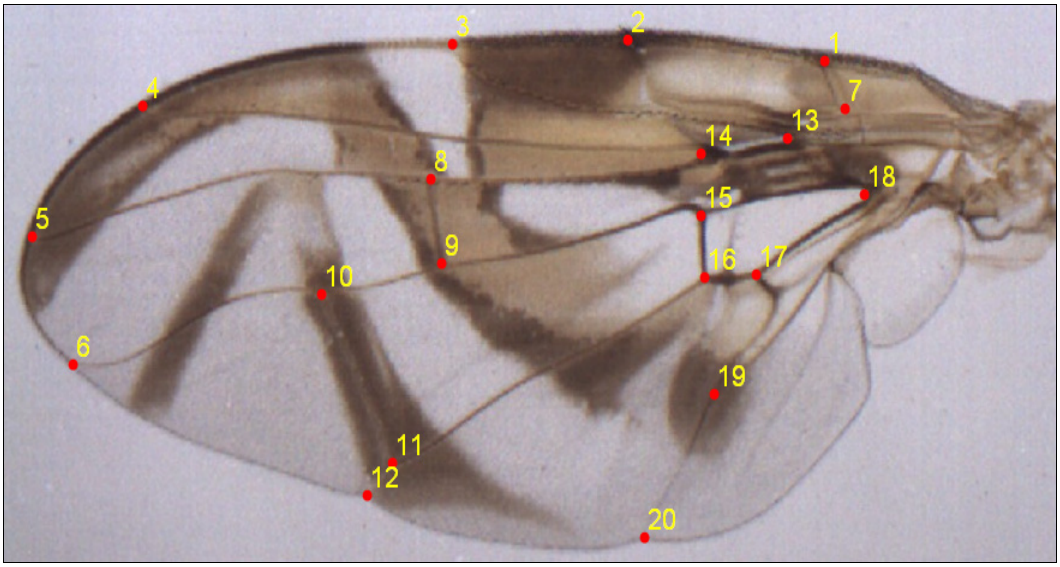


Figura 5 - Marcos anatômicos e descrição das nervuras da asa do complexo *fraterculus*

LANDMARKS	DESCRIÇÃO
1	Intersecção das nervuras costal e umeral (C e h)
2	Intersecção da nervura subcostal (Sc) e a borda da asa
3	Intersecção do setor radial $_1$ (R_1) e a borda da asa
4	Intersecção do setor radial $_{2+3}$ (R_{2+3}) e a borda da asa
5	Intersecção do setor radial $_{4+5}$ (R_{4+5}) e a borda da asa
6	Intersecção da nervura mediana (M) e a borda da asa
7	Intersecção das nervuras umeral e subcostal (h e Sc)
8	Intersecção da nervura r-m e o setor radial $_{4+5}$ (r-m e R_{4+5})
9	Intersecção das nervuras mediana e r-m (M e rm)
10	Intersecção das nervuras dm-cu e mediana (dm-cu e M)
11	Intersecção das nervuras CuA1 e dm-cu
12	Intersecção da nervura cubital A1 (CuA1) e a borda da asa
13	Intersecção das nervuras R_1 e R_{2+3}
14	Intersecção das nervuras R_{2+3} e R_{4+5}
15	Intersecção das nervuras M e m-cu
16	Intersecção das nervuras m-cu e CuA1
17	Intersecção da nervura CuA1 e ápice da célula cup
18	Intersecção da nervura M e base da célula bm
19	Intersecção da nervura A e ápice da célula cup
20	Intersecção da nervura anal (A) e a borda da asa

3.4.4 Análise dos dados morfométricos

3.4.4.1 Acúleo

Os dados das oito medidas realizadas no acúleo foram exportados diretamente para o programa Excel® e usados para calcular as médias e amplitudes da estrutura do acúleo e plotagem dos gráficos por meio do programa Satistica 9.0®.

3.4.4.2 Asa

A partir dos 20 marcos anatômicos foram geradas 36 medidas de deformações relativas (k=2n-4), sendo k representado pelo número total de deformações relativas e n o número de marcos anatômicos determinados. Por meio do programa TpsRewl versão 1.45 (ROHLF, 2007b), foram superpostas as configurações dos marcos anatômicos pelos métodos de quadrados mínimos. Esse método transforma uma configuração de marcos, superpondo-a em uma configuração de referência (consenso), de modo que a soma do quadrado das distâncias entre os pontos correspondentes em ambas as configurações seja a menor possível (MONTEIRO; REIS, 1999). Os consensos são os conjuntos de valores posicionais médios dos 20 pontos anatômicos amostrados para cada população estudada e são representados simultaneamente sob a forma de "asa consenso", que é a conformação alar média de cada população. Os escores das médias populacionais foram projetados no espaço entre as variáveis canônicas em gráficos de dispersão, que permitem visualizar a ordenação das populações em relação às variações de forma das asas analisadas, sendo os gráficos construídos pelo programa Satistica 9.0®. Os diagramas de deformação foram obtidos a partir da regressão da variável canônica sobre os componentes de forma, utilizando-se o programa TpsRegr 1.33 (ROHLF, 2007a). Foram aplicados os testes Wilks'Lambda ($P<0,0001$), Pillai's Trace ($P<0,0001$), Hotelling-Lawley Trace ($P<0,0001$) e Roy's Greatest Root ($P<0,0001$) para verificar a significância nos dados, utilizando-se o SAS System 9.2® (2008). O grau de similaridade das populações foi estimado mediante o cálculo das distâncias de Mahalanobis, sendo organizado na forma de tabelas e convertido em fenogramas, construídos conforme algoritmo UPGMA pelo programa Statistica 9.0®. Os programas de morfometria estão disponíveis gratuitamente em http://life.bio.sunysb.edu/morph/.

3.5 Análises moleculares

3.5.1 Preparo do material

Espécimes coletados originalmente em 70% etanol foram transferidos para 100% etanol e armazenados a -80ºC. Após a identificação das fêmeas como pertencente ao complexo *fraterculus*, o tórax de cada uma foi usado para a extração de DNA. Os demais segmentos (asa, abdômen e acúleo) permaneceram fixados em 100% etanol para análise morfométrica. Os morfotipos do complexo *fraterculus* foram separados com base nas variações morfológicas, sendo utilizados, quando possível, cinco espécimes de cada morfotipo para as análises moleculares.

Foram obtidas 60 sequências para a região da COI (32 para o município de Concepción e 28 para o município de Santa Rosa) e 34 sequências para a região ITS1 (14 para o município de Concepción e 20 para o município de Santa Rosa) (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 – Procedência dos espécimes utilizados na análise da região da COI, códigos utilizados nas análises moleculares, morfotipos (M1-M6 e Af)

Estado	**Município**	**M1**	**M2**	**M3**	**M4**	**M5**	**M6**	**AT**	**Total**
Concepción	Concepción - C	6	7	4	5	5	-	5	32
Misiones	Santa Rosa - SR	5	5	5	2	-	6	5	28
Total									**60**

Tabela 3 - Procedência dos espécimes utilizados na análise da região ITS1, códigos utilizados nas análises moleculares, morfotipos (M1-M6 e Af)

Estado	**Município - Código**	**M1**	**M2**	**M3**	**M4**	**M5**	**M6**	**Af**	**Total**
Concepción	Concepción - C	2	4	3	2	1	-	2	14
Misiones	Santa Rosa - SR	4	3	4	2	-	6	1	20
Total									**34**

3.5.2 Extração de DNA

As extrações de DNA foram realizadas seguindo-se o protocolo de extração do DNA genômico com sal (NaCl) (ALJANABI, MARTINEZ, 1997). Para cada extração foi utilizado o tórax de um indivíduo, o qual foi macerado em 400 µL de solução TEN (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA, pH 8,0; 400 mM NaCl), seguido da adição de solução de lise (40 µL de 20% SDS e 8 µL de proteinase K a 20 mg/mL) e tratamento térmico a 55 °C por 60 min. Após, foram adicionados 300 µL de 5-6 M de NaCl (solução aquosa saturada), misturados em vórtex por 15-30 segundos, centrifugados a temperatura ambiente (30 min a 18.188 g), sendo o sobrenadante misturado a um volume de 100% etanol ou isopropanol gelado e incubado a -20°C por, pelo menos, 1 h para a precipitação do DNA. As amostras foram então centrifugadas a 4°C por 20 min a 18.188 *g* e o DNA lavado em 1 mL de etanol a 100% e centrifugado novamente a 4°C por 5 min a 14.000 *g*. O precipitado foi novamente lavado com 1 mL de 70% etanol e centrifugado a 4°C por 5 min a 18.188 *g*, por duas vezes. A amostra foi então mantida em temperatura ambiente por 15-20 min e o DNA ressuspenso em 20 µL de H_2O milli-Q (Millipore) estéril. A integridade do DNA extraído foi avaliada em gel de agarose a 0,8% contendo 0,5µg/mL de brometo de etídeo em tampão tris-acetato-EDTA (TAE) a 5V/cm, e visualizada em transluminador (UV).

3.5.3 Marcadores moleculares

Para a caracterização molecular dos diferentes morfotipos de *A. fraterculus* selecionados foram utilizados marcadores mitocondriais e nucleares. Como marcador mitocondrial, foi utilizada uma porção da subunidade I da citocromo oxidase (COI – marcador mitocondrial) (Figura 6), enquanto a região espaçadora ITS1 foi selecionada como marcador nuclear (Figura 7).

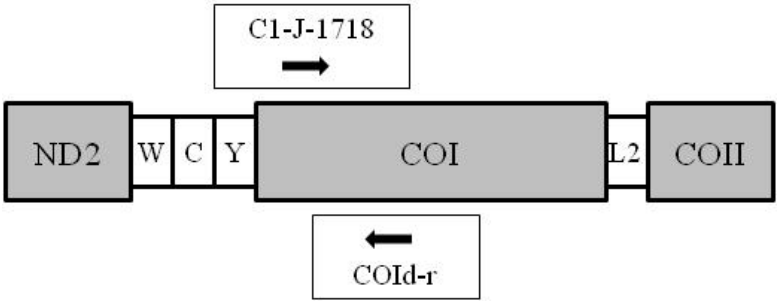


Figura 6 - Representação do trecho do DNA mitocondrial onde se encontra o gene COI e localização aproximada dos iniciadores utilizados na amplificação do fragmento em estudo

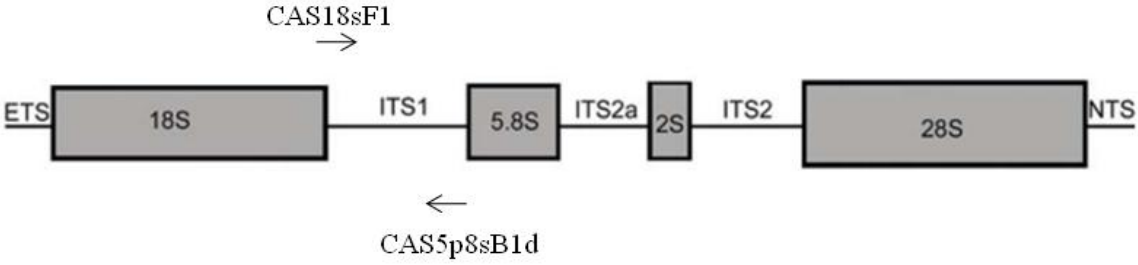


Figura 7 - Organização do DNA ribossômico (DNAr) em *Ceratitis* (modificado de DOUGLAS; HAYMER, 2001). Os blocos em cinza representam as regiões codificadoras, as linhas representam a região não-codificadora (ITS). Localização aproximada dos iniciadores utilizados neste trabalho

As regiões selecionadas para as análises moleculares foram amplificadas utilizando-se de iniciadores universais (Tabela 4), em reações de amplificação contendo 2,0µL de gDNA (concentração indeterminada), 5µL de 5x PCR buffer, 1,5mM $MgCl_2$, 200 µM de dNTP/cada, 0,32 µM de cada iniciador, 0,25 unidades de Taq polimerase (Promega®) e água MilliQ estéril para volume final de 25 µl.

Tabela 4 - Oligonucleotídeos iniciadores usados nas reações de amplificação via PCR

Regiões	Iniciadores	Sequências	Referências
COI	C1-J-1718	5'-GGA GGAT TTG GAA ATT GAT TAG TTC C-3'	Simon et al. (1994)
	COId-r	5'-GGG CTC ATA CAA TAA ATC CTA AT-3'	Ruiz-Arce, R (2009)
ITS1	CAS18sF1	5'-TAC ACA CCG CCC GTC GCT ACT A-3'	Jie et al. (2003)
	CAS5p8sB1d	5'-ATG TGC GTT CRA AAT GTC GAT GTT CA-3'	Jie et al. (2003)

As reações de amplificação seguiram parâmetros de termociclagem distintos, sendo de 95°C por 5 min (1x); 95°C por 45 s, 45°C por 45 s, 72°C por 1 min (40x); 72°C por 1 min para COI, e de 94°C por 2 min (1x); 94°C por 1 min, 54°C por 1 min, 72°C por 1 min (40x); 72°C por 5 min para a região do ITS1.

Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose a 1,5% contendo 0,5µg/mL de brometo de etídeo para a coloração dos fragmentos de DNA, em tampão tris-acetato-EDTA (TAE), a 5V/cm. A visualização do gel foi feita em transluminador (UV) acoplado a sistema de aquisição de imagens em sistema digitalizador GelCapture® 4.1.11.4. Os produtos de PCR foram purificados após adição de 0,1 volume de 3M acetato de sódio e 2,5 volumes de 95% etanol gelado à reação de amplificação, e incubação a -20 °C por 16 h. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas à temperatura ambiente (10 min a 18.188 *g*), o precipitado foi lavado com 500 µL de 80% etanol e novamente centrifugado à temperatura ambiente (5 min a 18.188 *g* – 2x). A amostra foi mantida à temperatura ambiente para completa evaporação do etanol, o DNA ressuspenso em 10 µL de H_2O milli-Q (Millipore) autoclavada e armazenado a -20°C para sequenciamento.

3.5.4 Sequenciamento do DNA

Os produtos de PCR purificados foram submetidos ao sequenciamento bidirecional utilizando-se dos mesmos iniciadores empregados nas reações originais de amplificação. As sequências foram processadas pelo Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH-USP) (http://genoma.ib.usp.br/servicos/sequenciamento.php), de acordo com o protocolo para ABI3730, utilizando o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Todas as sequências obtidas foram editadas manualmente no programa FinchTV 1.4.0 (http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/FinchTV.shtml) e analisadas no programa BioEdit (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) para comparação das fitas e eliminação de erros de leitura.

3.5.5 Alinhamento e análise dos dados moleculares

As sequências foram alinhadas utilizando-se a ferramenta ClustalW, com penalidade por intervalo aberto (*gap opening penalty*) igual a 15,0 e penalidade pela extensão do intervalo (*gap extension penalty*) igual a 6,66. Todas as análises foram conduzidas utilizando-se do pacote estatístico MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007).

As redes de haplótipos foram construídas com os dados da COI usando o programa TCS versão 1.21 (CLEMENT et al., 2002). Este programa utiliza dados estatísticos de probabilidade baseados no critério da parcimônia para estimar genealogias por meio de sequências de DNA (TEMPLETON et al., 1992).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises morfométricas com base nos acúleos

4.1.1 Análise discriminante

O gráfico da função discriminante revelou que todas as variações morfológicas diferem entre si em ambos os municípios estudados. A análise revelou ainda, que houve isolamento de um indivíduo nos morfotipos M3, M4 e Af, e de dois indivíduos no morfotipo M5, no município de Concepción (Figura 8). Por outro lado, houve isolamento apenas dos indivíduos do morfotipo M4 no município de Santa Rosa, contudo só foram estudados dois indivíduos dessa variação morfológica (Figura 9).

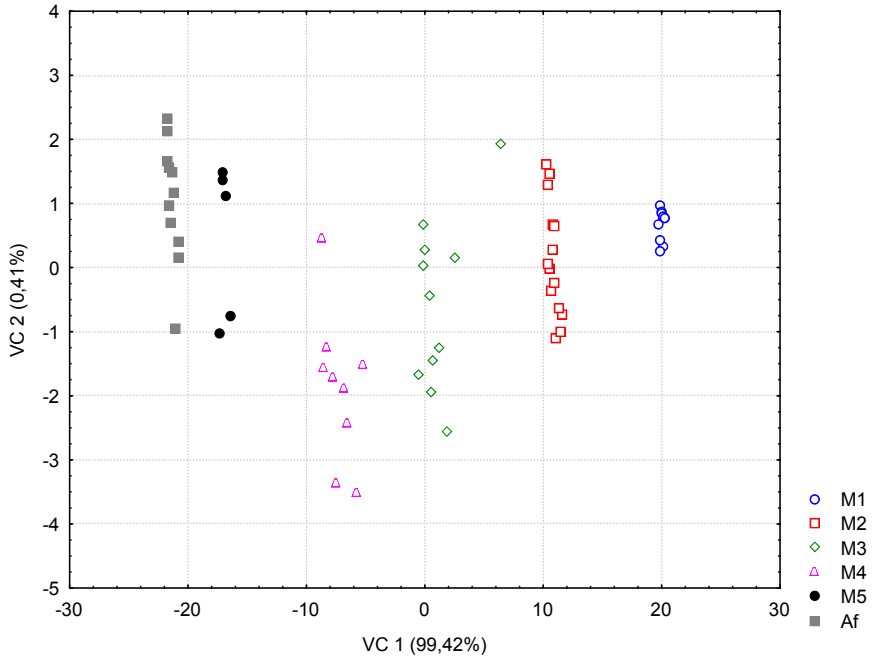


Figura 8 – Gráfico de dispersão de espécimes do complexo *fraterculus*, separados em morfotipos (M1-M5 e Af), do município de Concepción no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas a partir de oito medidas no acúleo

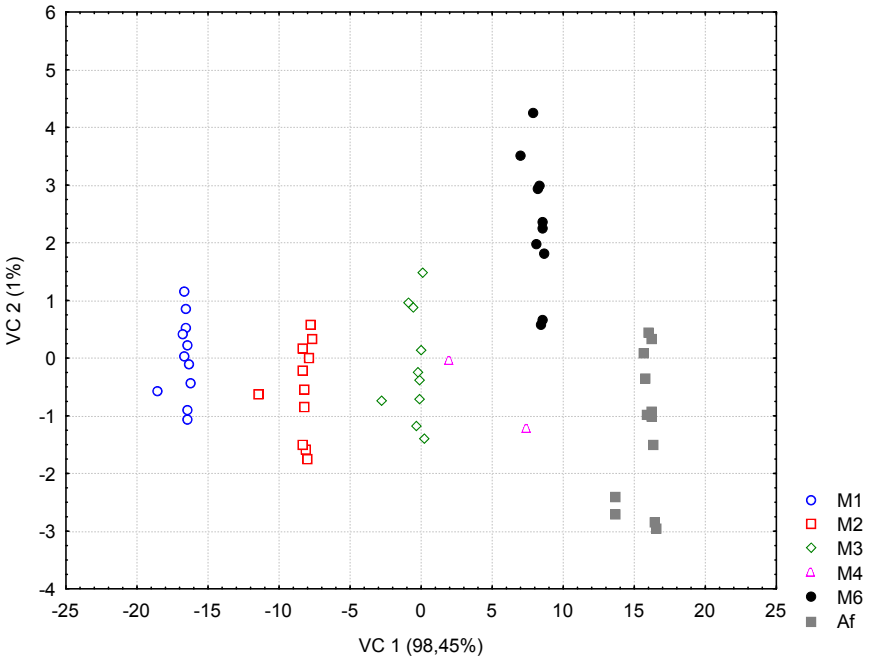


Figura 9 – Gráfico de dispersão de espécimes do complexo *fraterculus*, separados em morfotipos (M1-M4, M6 e Af), do município de Concepción no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas a partir de oito medidas no acúleo

4.1.2 Análise de Agrupamento

O agrupamento dos morfotipos do complexo *fraterculus* revelou a formação de dois grandes grupos a partir das distâncias 44 e 58 (município de Concepción e Santa Rosa, respectivamente) (Figuras 10 e 11).

No município de Concepción, um dos grupos formado constituiu-se dos morfotipos com acúleo típico do complexo *fraterculus* (Af) e constrição pouco definida e ápice não robusto (M5). Esse morfotipo com exceção de apenas um indivíduo, inserido no grupo, foi formado pelos demais morfotipos divididos em subgrupos (Figura 10). No município de Santa Rosa, um dos grupos foi formado pelos morfotipos de ápice do acúleo alongado e constrição definida (M1), ápice não alongado e constrição definida (M2) e constrição definida e dentes mal-formados (M3), esta com exceção de apenas dois indivíduos, inseridos no outro grupo, representado pelos demais morfotipos divididos em subgrupos (Figura 11).

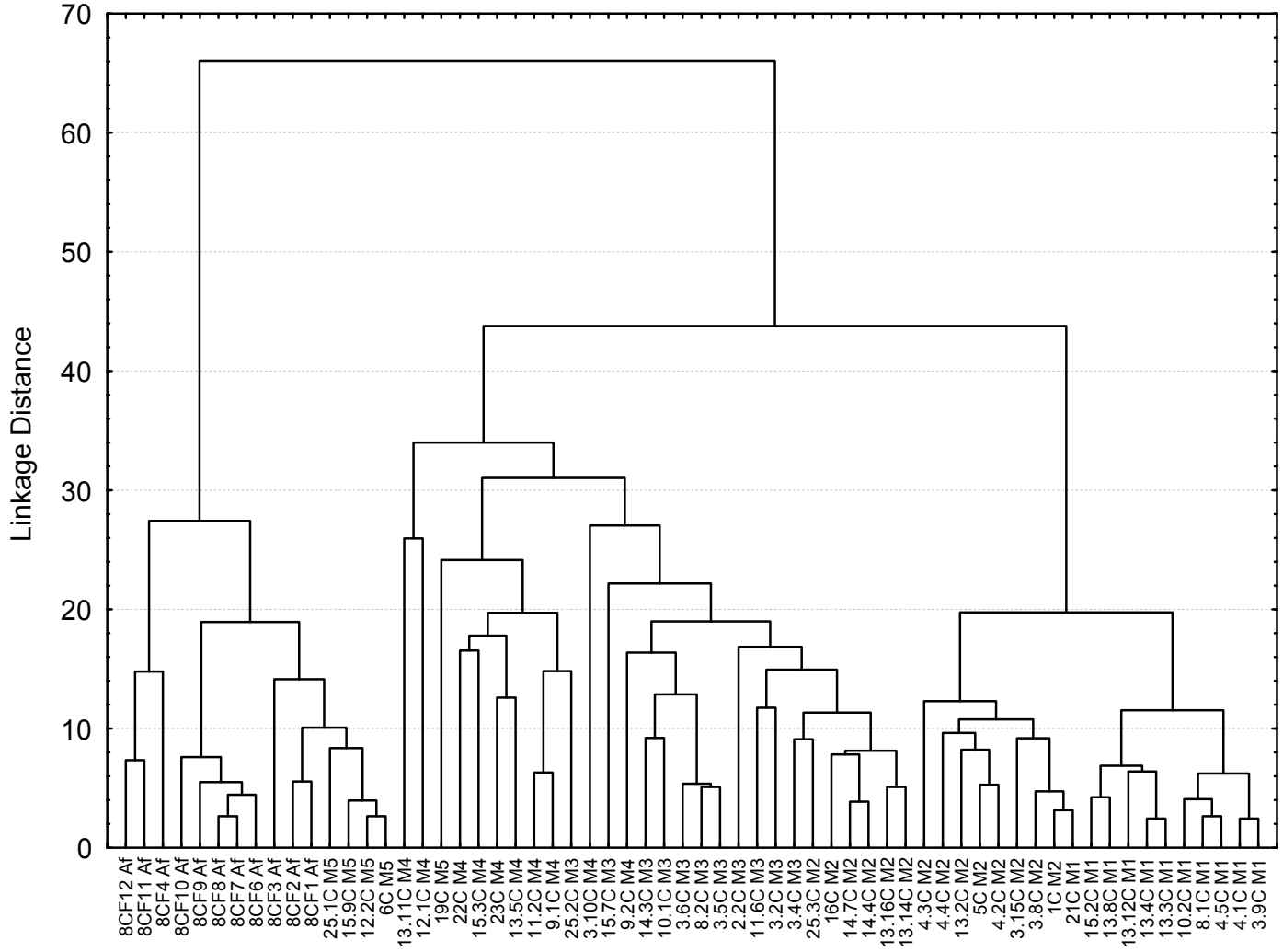


Figura 10 – Fenograma de espécimes do complexo *fraterculus*, separados em morfotipos (M1-M5 e Af), do município de Concepción, gerado a partir de oito medidas no acúleo

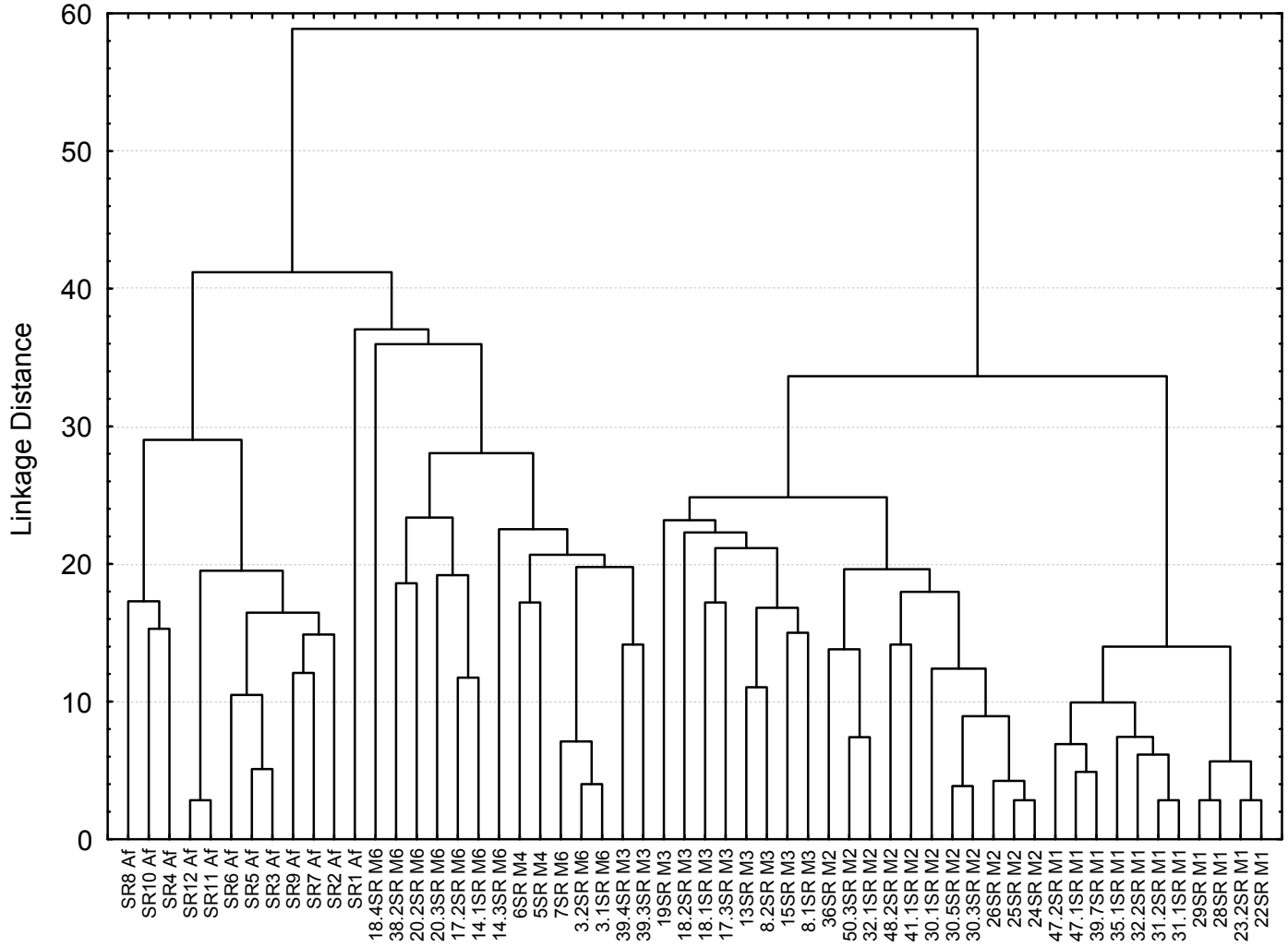


Figura 11 – Fenograma de espécimes do complexo *fraterculus*, separados em morfotipos (M1-M4, M6 e Af), do município de Santa Rosa, gerado a partir de oito medidas no acúleo

4.1.3 Variação morfométrica do acúleo

A) Variação no comprimento do ápice do acúleo

O comprimento do ápice do acúleo apresentou uma variação considerável nos morfotipos estudados, em ambos os municípios, cujas medidas variaram entre 0,22 a 0,32 mm (município de Concepción) (Figura 12) e 0,23 a 0,32 mm (município de Santa Rosa) (Figura 13). Os valores médios das medidas do ápice concentram-se entre 0,25 e 0,29 (Concepción) e 0,24 e 0,29 (Santa Rosa). Esses resultados concordam com os dados encontrados por Araujo e Zucchi (2006), os quais estudaram populações de *A. fraterculus* de 15 localidades brasileiras e obtiveram um intervalo de variação de 0,20 a 0,30 mm e valores médios das medidas do ápice entre 0,22 e 0,28 mm. O intervalo de medidas encontrado está também de acordo com o intervalo de 0,25 a 0,27 (STEYSKAL, 1977) e o valor médio de 0,26 mm (ZUCCHI, 1977).

No município de Concepción, a maior amplitude no ápice do acúleo foi observada no morfotipo 5 (M5), o qual carateriza-se pela constrição pouco definida e ápice não robusto, presente apenas nesse município. Por outro lado, as populações de ápice não alongado e constrição definida (M2), constrição definida e dentes mal-formados (M3) e dos exemplares com acúleo típico do complexo *fraterculus* (Af) apresentaram a menor amplitude (Figura 12).

No município de Santa Rosa, a maior amplitude foi observada nos espécimens típicos de *A. fraterculus* (Af) e a menor amplitude foi observada na população de ápice não alongado e constrição definida (M2) (Figura 13).

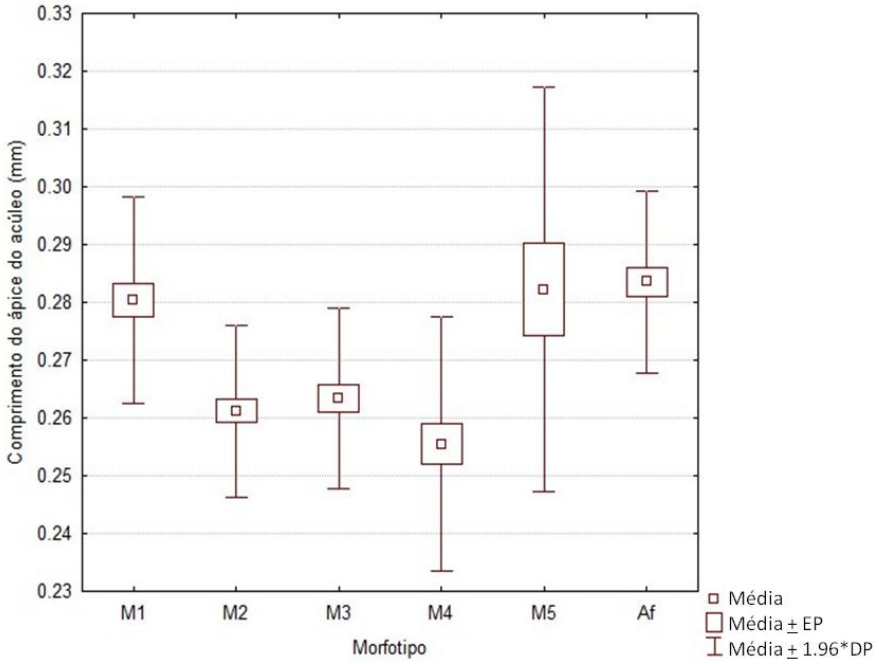


Figura 12 – Variação morfométrica do ápice do acúleo de espécimes do complexo *fraterculus*, separados em morfotipos (M1-M5 e Af), do município de Concepción

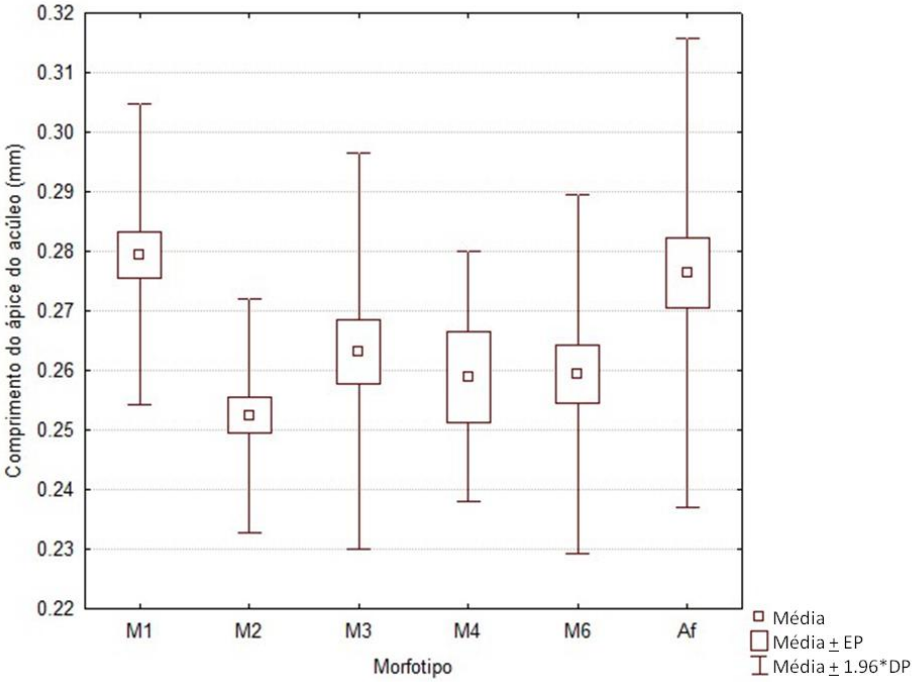


Figura 13 – Variação morfométrica do ápice do acúleo de espécimes do complexo *fraterculus*, separados em morfotipos (M1-M4, M6 e Af), do município de Santa Rosa

B) Variação no comprimento total do acúleo

O comprimento total do acúleo variou de 1,53 a 1,94 mm (Concepción) e 1,5 a 2,1 mm (Santa Rosa) (Figuras 14 e 15, respectivamente). Os valores médios concentram-se entre 1,59 e 1,80 mm (Concepción) e 1,58 e 1,90 mm (Santa Rosa). Assim, como os valores das medidas no ápice, os valores encontrados para o comprimento total do acúleo concordam com os resultados obtidos por Araujo e Zucchi (2006), os quais estudaram populações de *A. fraterculus* de 15 localidades brasileiras e obtiveram um intervalo de variação de 1,40 a 1,90 mm e valores médios das medidas do comprimento total entre 1,59 e 1,76 mm. Stone (1942) relatou que o comprimento do acúleo de *A. fraterculus* varia de 1,50 a 1,95 mm e Zucchi (1977) informou a existência de uma variação de 1,50 a 2,0 mm.

Analisando-se os morfotipos do município de Concepción, tem-se que a maior amplitude no comprimento do acúleo foi observada no morfotipo de ápice não alongado e constrição definida (M2) e a menor amplitude foi observada no morfotipo dos espécimes com acúleo típico do complexo *fraterculus* (Af) (Figura 14). Em contrapartida, no município de Santa Rosa, obteve-se a maior amplitude nos morfotipos de ápice do acúleo alongado e constrição definida (M1) e nos morfotipos com constrição definida e dentes mal-formados (M3). Por outro lado, a menor amplitude foi observada no morfotipo de constrição pouco definida e ápice robusto (M4), (apenas dois indivíduos analisados) (Figura 15).

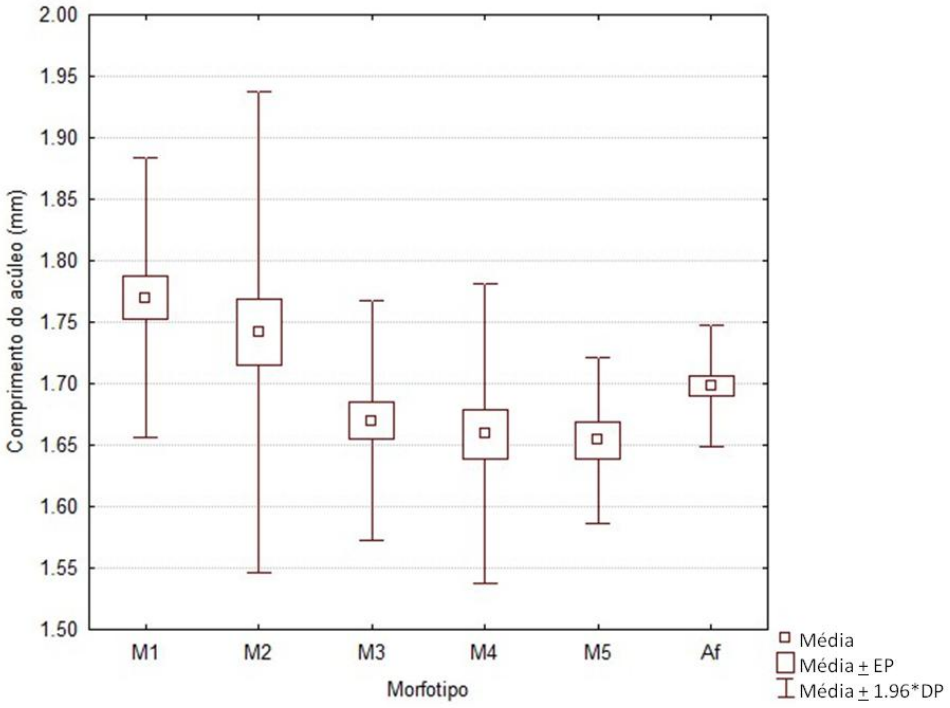


Figura 14 – Variação morfométrica do acúleo de espécimes do complexo *fraterculus*, separados em morfotipos (M1-M5 e Af), do município de Concepción

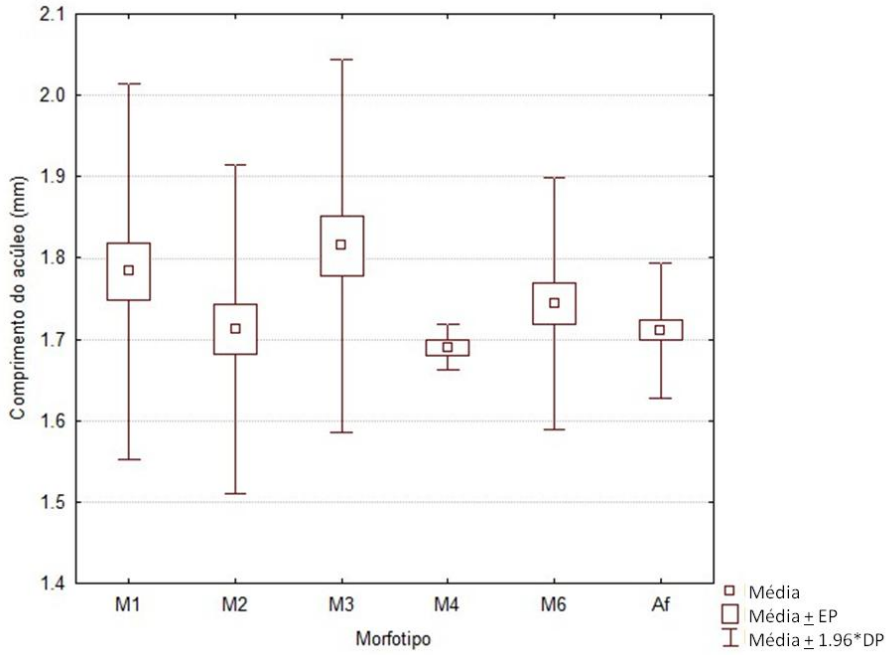


Figura 15 – Variação morfométrica do acúleo de espécimes do complexo *fraterculus*, separados em morfotipos (M1-M4, M6 e Af), do município de Santa Rosa

4.2 Análises morfométricas com base nas asas

4.2.1 Análises das variáveis canônicas (AVC)

A análise baseada nas variáreis canônicas VC1 e VC2, gerada a partir das coordenadas posicionais em plano cartesiano dos 20 pontos anatômicos da asa esquerda de espécimes do complexo *fraterculus*, revelou dissimilaridades entre os morfotipos estudados. Os testes multivariados Wilks' Lambda (P<0,0001), Pillai's Trace (P<0,0001) e Roy's Greatest Root (P<0,0001) mostraram que os eixos canônicos foram estatisticamente significativos.

Os gráficos de dispersão dos indivíduos, no espaço das variáveis canônicas (VC1 e VC2) (Figuras 16 e 17), de ambos os municípios (Concepción e Santa Rosa) apresentaram algumas semelhanças. Os morfotipos tenderam a se separar, porém há pequenas inserções nos conjuntos formados. No gráfico de dispersão dos indivíduos para o município de Concepción (Figura 16), observou-se que o morfotipo M1 (ápice do acúleo alongado e constrição definida) sobrepôs cerca de 40% com o morfotipo M2 (ápice não alongado e constrição definida). Os demais morfotipos se separaram, exceto o morfotipo M5 (constrição pouco definida e ápice não robusto) cujos indivíduos ficaram dispersos ao redor do morfotipo M4 (constrição pouco definida e ápice robusto). Para o município de Santa Rosa (Figura 17), observou-se que o morfotipo Af (acúleo típico do complexo *fraterculus*) sobrepôs cerca de 10% com o morfotipo M1 e cerca de 20% com o morfotipo M2. Além disso, o morfotipo M6 (constrição pouco definida e dentes mal-formados) sobrepôs cerca de 50% com o morfotipo M3 (constrição definida e dentes mal-formados); enquanto o morfotipo M4 ficou totalmente distante das demais.

A partir da regressão dos valores de VC1 e VC2 sobre os componentes de forma, foram construídos os diagramas de deformação que se encontram ao redor dos gráficos das variáveis canônicas. Esses diagramas indicam a conformação alar dos indivíduos, conforme os valores das variáveis canônicas (VCs) ao longo dos eixos dessas variáveis, ou seja, quanto mais próximo dos eixos das VCs estiver o indivíduo, as asas terão maior semelhança àquela conformação extrema (Figuras 16 e 17).

A partir da análise dos diagramas de deformação, podemos fazer as seguintes observações para os morfotipos do complexo *fraterculus* do município de Concepción (Figura 16). O primeiro eixo canônico contém 47% da variação entre os grupos, relativo à variação dentro dos grupos, observa-se uma acentuada separação dos morfotipos M3, M4 e Af, ao passo

que M1 separa-se parcialmente dos morfotipos M2 e M5. Esse grupo de morfotipos, como mencionado acima, sobrepõe-se consideravelmente, no eixo positivo da variável canônica 1, estando os morfotipo ordenados em um contínuo de variação na forma da asa ao longo desse primeiro eixo. As deformações hipotéticas ao longo do primeiro e segundo eixos canônicos representam uma possível mudança na forma da asa prevista na variação dos escores dos dois eixos canônicos. Nos extremos inferior e superior do primeiro eixo canônico (VC1), as principais mudanças da asa estão associadas às nervuras R_1 (intervalo dos marcos 3 e 13), R_{2+3} (intervalo dos marcos 4 e 14), R_{4+5} (intervalo dos marcos 5 e 8), M (intervalo dos marcos 6 e 18) e CuA1 (intervalo dos marcos 12 e 16). Assim, os morfotipos M4, M5 e Af, localizados no extremo inferior de VC1 (escore negativo), apresentam asas ligeiramente mais curtas em relação aos demais morfotipos localizados no extremo superior de VC1 (escore positivo). A maior variação foi observada entre os marcos 5 e 8, que representa a nervura R_{4+5}, ou seja, ocorreu alongamento da nervura resultante do afastamento desses pontos, permitindo o alongamento da região médio-apical da asa. A nervura M (marcos 6 e 18) também encontra-se mais alongada contribuindo para esse formato. Os demais morfotipos, localizados no extremo superior de VC1 (escore positivo), apresentaram asas de largura semelhante aos morfotipos anteriores. As duas primeiras variáveis canônicas explicam 70% da variação total entre os morfotipos do município de Concepción, sendo que o primeiro eixo canônico explicou 47% e o segundo 23% (Figura 16).

A análise dos diagramas de deformação nos permite observar as seguintes diferenças dentro dos morfotipos do complexo *fraterculus* do município de Santa Rosa (Figura 17). O primeiro eixo canônico contém 44% da variação entre os grupos relativa à variação dentro dos grupos, foi observada a separação parcial de todos os morfotipos, em relação ao primeiro eixo canônico (VC1), com exceção do morfotipo M4, que se separou totalmente das demais. Esse grupo de morfotipos sobrepõe-se consideravelmente dentro do extremo inferior do eixo canônico 2 (VC2) (escore negativo), enquanto no extremo superior do VC2 (escore positivo) observa-se separação total do morfotipo M4. Nos extremos inferior e superior do primeiro eixo canônico (VC1), as principais mudanças na asa estão associadas às nervuras R_1 (intervalo dos marcos 3 e 13), R_{2+3} (intervalo dos marcos 4 e 14), R_{4+5} (intervalo dos marcos 5 e 8), M (intervalo dos marcos 6 e 18), CuA1 (intervalo dos marcos 12 e 16) e A (intervalo dos marcos 19 e 20). Assim, os morfotipos M3 e M6, localizados no extremo inferior de VC1 (escore negativo), apresentam asas mais curtas e largas em relação aos demais morfotipos localizados no extremo superior de

VC1 (escore positivo). As maiores variações foram observadas entre os marcos 4 e 14 (nervura R_{2+3}), 5 e 8 (nervura R_{4+5}), 6 e 18 (nervura M) e 12 e 16 (nervura CuA1), ou seja, ocorreu encurtamento das nervuras resultante da aproximação desses pontos, permitindo o encurtamento da região médio-apical da asa. A nervura A (marcos 19 e 20) encontra-se mais alongada contribuindo para esse formato. O contrário aconteceu para os demais morfotipos localizadas no extremo superior de VC1 (escore positivo), os quais apresentaram asas mais compridas e estreitas. As duas primeiras variáveis canônicas explicam 79% da variação total entre os morfotipos do município de Santa Rosa, sendo que o primeiro eixo canônico explicou 44% e o segundo 25% (Figura 17).

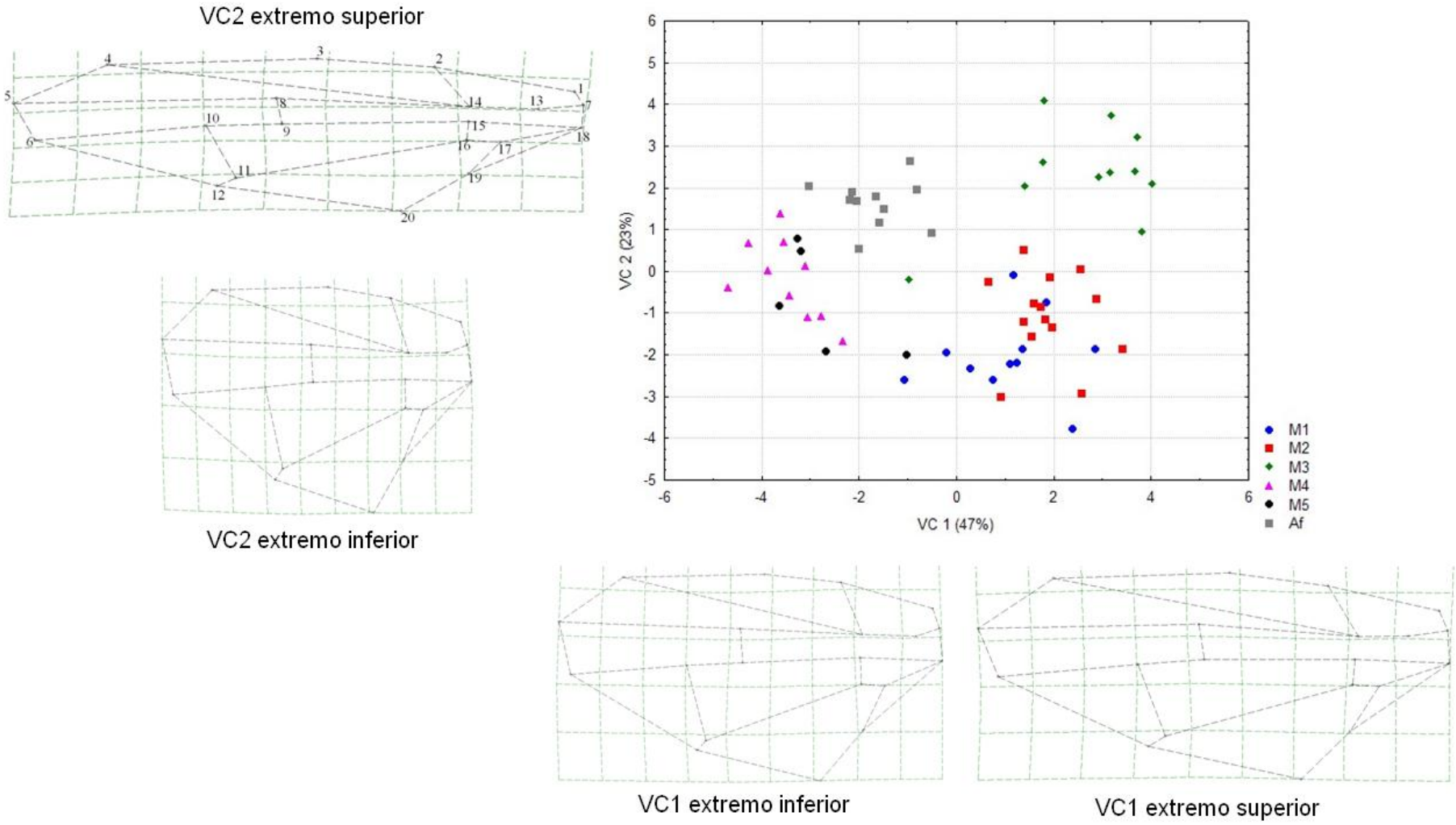


Figura 16 – Gráfico de dispersão de espécimes do complexo *fraterculus*, separados em morfotipos (M1-M5 e Af), do município de Concepción no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas após análise de coordenadas posicionais em plano cartesiano de 20 pontos anatômicos da asa. Os diagramas de conformações ao redor do gráfico indicam as conformações alares presumíveis para indivíduos situados no extremo superior e inferior das variáveis canônicas. As magnitudes das deformações foram aumentadas em 3X para visualização

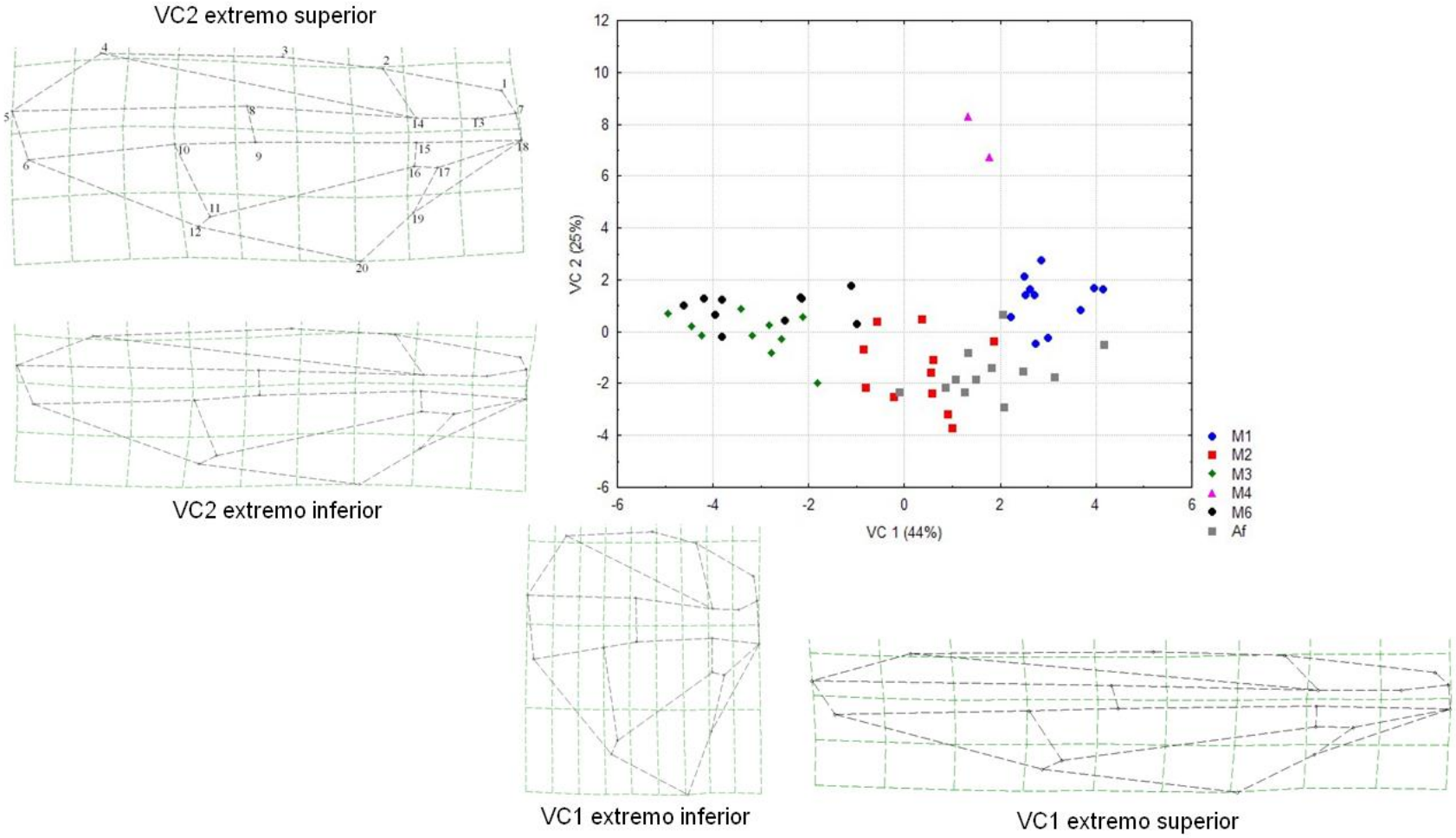


Figura 17 - Gráfico de dispersão de espécimes do complexo *fraterculus*, separados em morfotipos (M1-M4, M6 e Af), do município de Santa Rosa no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas após análise de coordenadas posicionais em plano cartesiano de 20 pontos anatômicos da asa. Os diagramas de conformações ao redor do gráfico indicam as conformações alares presumíveis para indivíduos situados no extremo superior e inferior das variáveis canônicas. As magnitudes das deformações foram aumentadas em 3X para visualização

4.2.2 Análise de agrupamento

Os valores das distâncias de Mahalanobis (Tabelas 5 e 6), calculados a partir dos agrupamentos de forma dos morfotipos do complexo *fraterculus* de ambos os municípios (Concepción e Santa Rosa), foram estudados pela análise de *cluster* (UPGMA), onde foram gerados os dendrogramas (Figuras 18 e 19). De acordo com a análise de Mahalonobis, para o município de Concepción (Figura 18), observa-se que ocorre similaridade morfológica entre os morfotipos M3 (constrição definida e dentes mal-formados), M4 (constrição pouco definida e ápice robusto) e M1 (ápice do acúleo alongado e constrição definida), M2 (ápice não alongado e constrição definida) e Af (acúleo típico do complexo *fraterculus*), sendo que, o morfotipo M5 (constrição pouco definida e ápice não robusto) foi a mais distante de todas. Apesar de esse morfotipo ter sido visualizado ao redor da M4, no gráfico de dispersão (Figura 16), foi possível verificar, na análise de *cluster*, que esse morfotipo encontra-se nos limites entre os agrupamentos formados.

Analisando-se os morfotipos do município de Santa Rosa (Figuras 19), novamente observa-se a formação de agrupamentos distintos para os morfotipos. Na análise de *cluster* das distâncias de Mahalanobis, verifica-se que ocorre similaridade morfológica entre os morfotipos M1 (ápice do acúleo alongado e constrição definida) e M3 (constrição definida e dentes mal-formados), M6 (constrição pouco definida e dentes mal-formados), Af (acúleo típico do complexo *fraterculus*) e M4 (constrição pouco definida e ápice robusto), sendo que, o morfotipo M2 (ápice não alongado e constrição definida) foi a mais distante de todas. Apesar de esse morfotipo ter sido visualizada entre o morfotipo M6 e os limites de Af, no gráfico de dispersão (Figura 17), foi possível verificar, na análise de *cluster*, que esse morfotipo encontra-se nos limites entre os agrupamentos formados.

Assim, os dendrogramas possibilitam a determinação da proximidade dos morfotipos estudados, de ambos os municípios (Concepción e Santa Rosa), demonstrando, portanto, a ocorrência de variação em *A. fraterculus*.

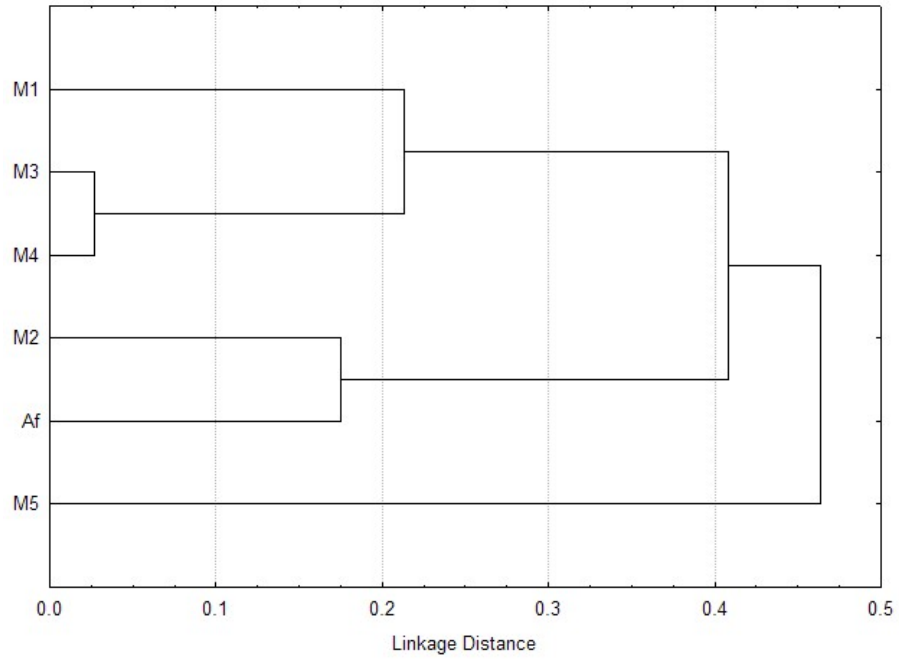


Figura 18 – Dendrograma para as variações morfológicas do complexo *fraterculus* do município de Concepción gerado por análise de *cluster* (UPGMA) a partir de distâncias de Mahalanobis apresentadas na Tabela 5

Tabela 5 – Distâncias de Mahalanobis de variações morfológicas do complexo *fraterculus* do município de Concepción calculados a partir dos componentes de forma das asas

Populações	M1	M2	M3	M4	M5	Af
M1	-					
M2	0.913	-				
M3	0.256	0.490	-			
M4	0.170	0.053	0.027	-		
M5	0.359	0.331	0.133	0.861	-	
Af	0.233	0.175	0.162	0.599	0.634	-

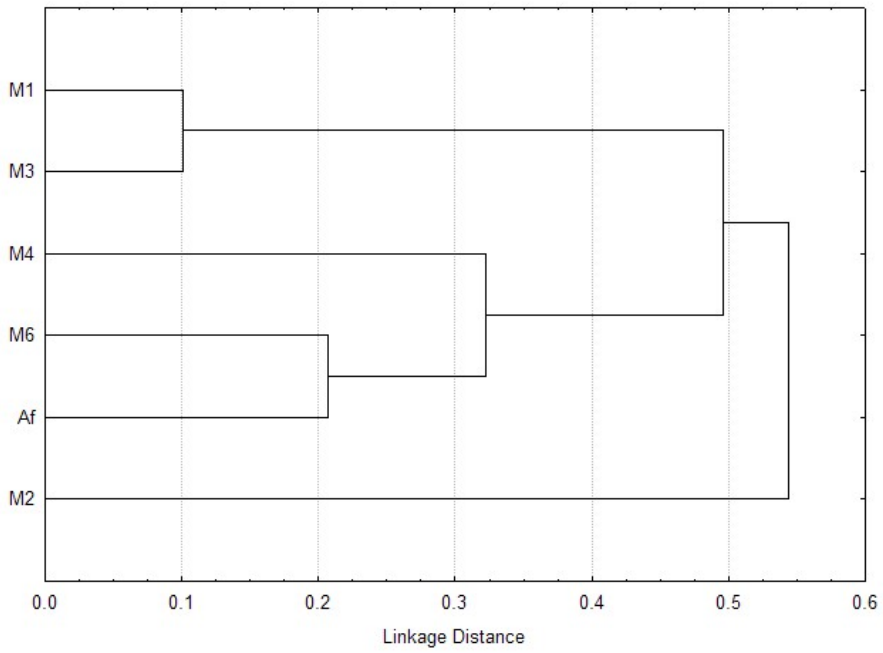


Figura 19 – Dendrograma para as variações morfológicas do complexo *fraterculus* do município de Santa Rosa gerado por análise de *cluster* (UPGMA) a partir de distâncias de Mahalanobis apresentadas na Tabela 6

Tabela 6 – Distâncias de Mahalanobis de variações morfológicas do complexo *fraterculus* do município de Santa Rosa calculados a partir dos componentes de forma das asas

Populações	M1	M2	M3	M4	M6	Af
M1	-					
M2	0.490	-				
M3	0.101	0.565	-			
M4	0.546	0.346	0.357	-		
M6	0.181	0.404	0.837	0.327	-	
Af	0.775	0.912	0.278	0.318	0.207	-

Analisando-se os indivíduos a partir da Distância Euclidiana, tem-se os agrupamentos apresentados nas Figuras 20 e 21.

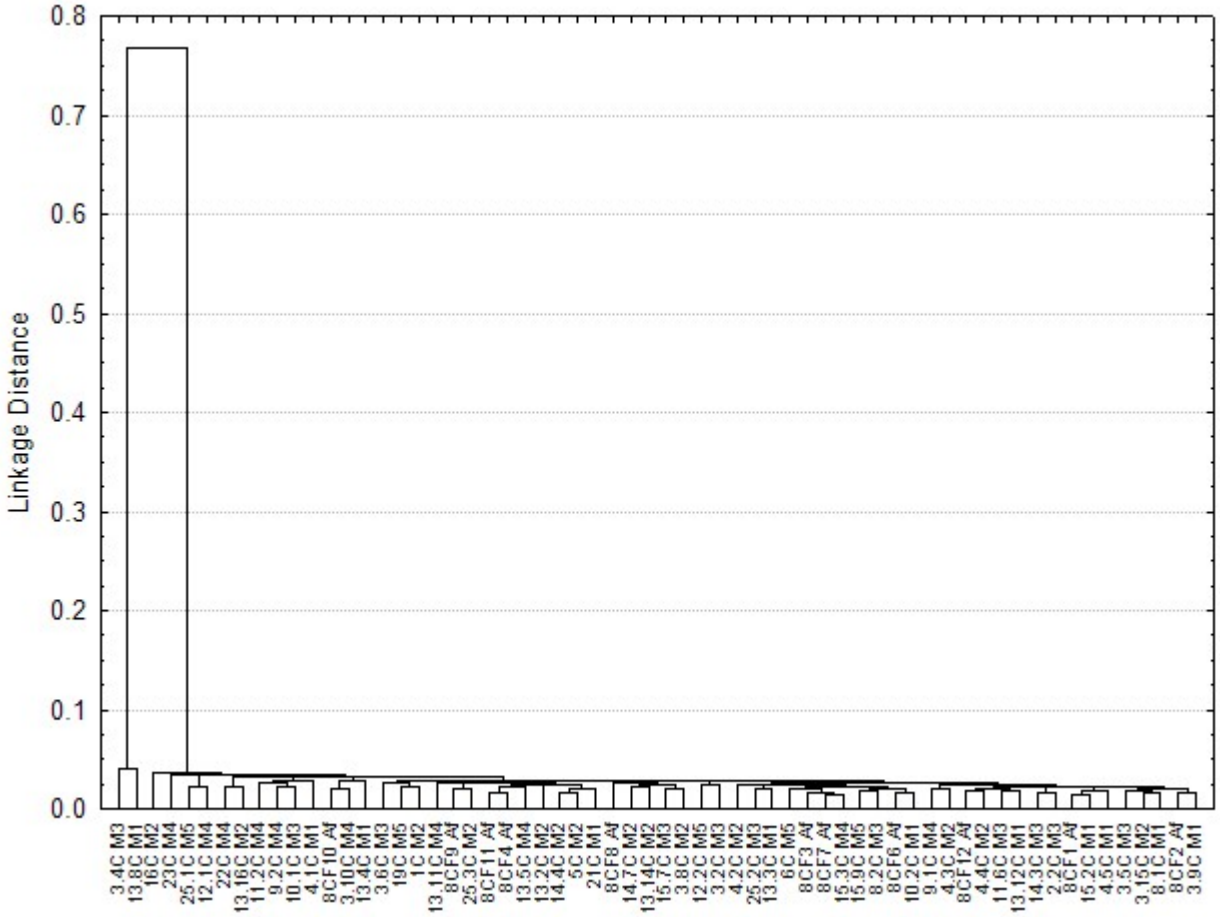


Figura 20 – Dendrograma para as variações morfológicas do complexo *fraterculus* do município de Concepción gerado por análise de *cluster* (UPGMA) a partir de distância Euclidiana

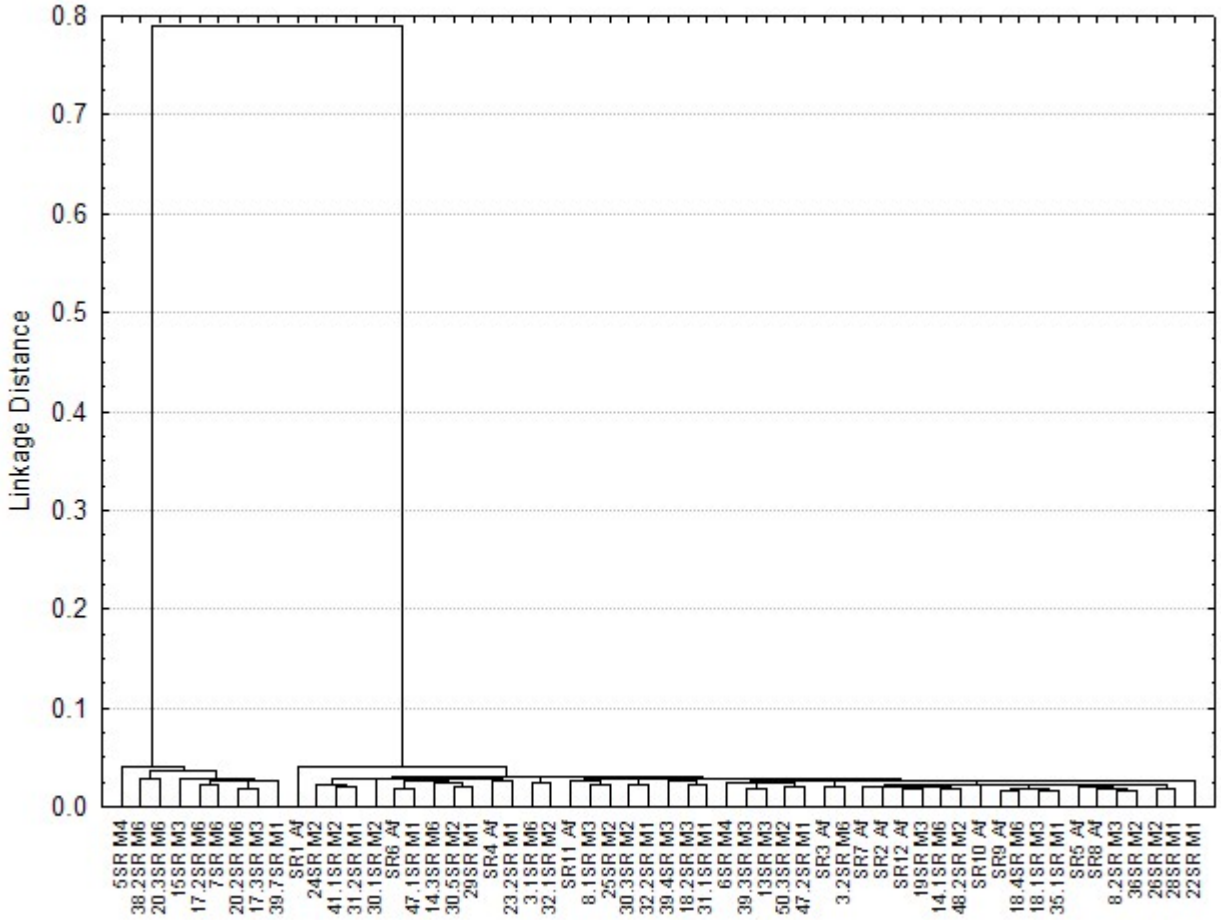


Figura 21 – Dendrograma para as variações morfológicas do complexo *fraterculus* do município de Santa Rosa gerado por análise de *cluster* (UPGMA) a partir de distância Euclidiana

4.2.3 Centróide

O grau de variação entre os morfotipos do complexo *fraterculus*, de ambos os municípios (Concepción e Santa Rosa), foi analisado nas asas com base no tamanho do centróide, a partir dos gráficos das médias, erro-padrão e desvio-padrão (intervalo de confiança 1,96%). O centróide constitui um ponto imaginário, que representa o centro geométrico da asa, determinado pela média dos valores posicionais no plano cartesiano de todos os pontos anatômicos da asa; representa o centro de massa de uma configuração, fundamental para a definição de tamanho. Assim, o tamanho da asa é representado em termos de tamanho de centróide (MONTEIRO; REIS, 1999). Os espécimes do município de Santa Rosa apresentaram asas relativamente maiores, quando comparados aos do município de Concepción (Figuras 22 e 23).

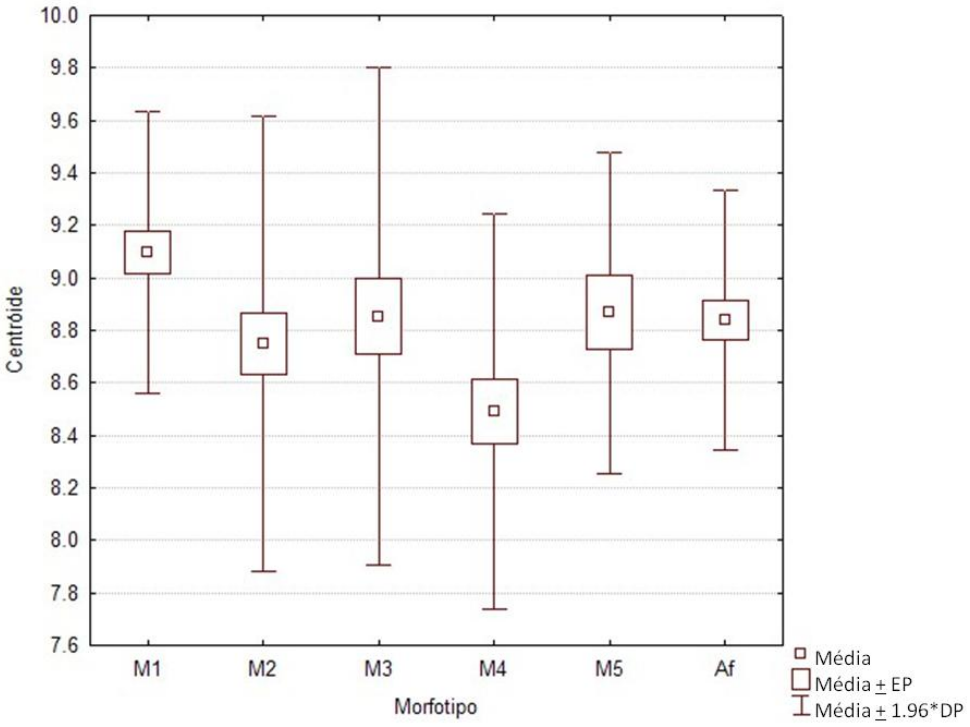


Figura 22 – Centróide para as variações morfológicas do complexo *fraterculus* do município de Concepción

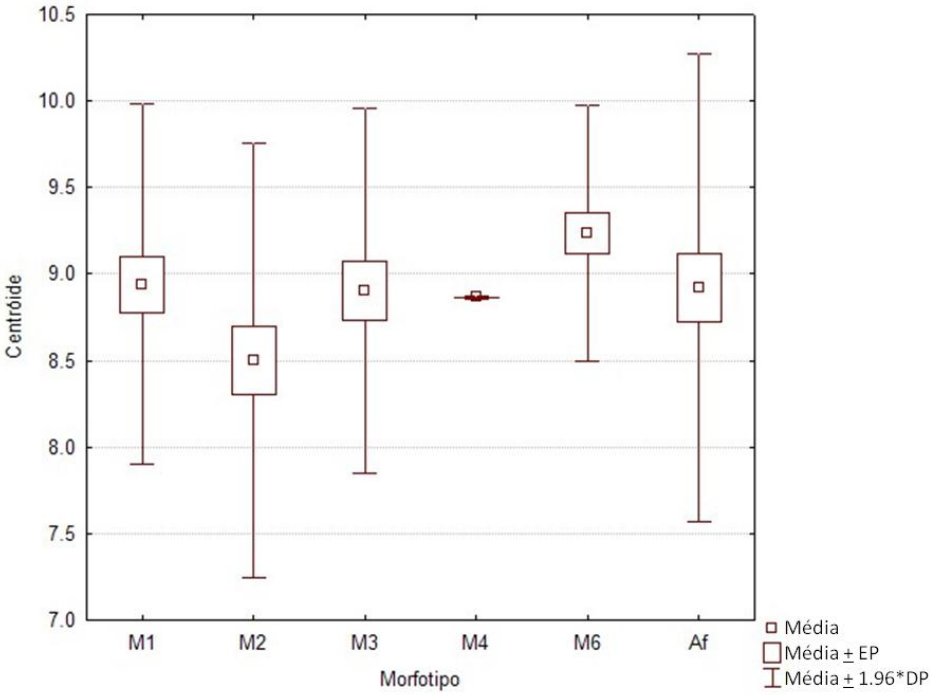


Figura 23 – Centróide para as variações morfológicas do complexo *fraterculus* do município de Santa Rosa

4.3 Análises moleculares

4.3.1 Região do COI

As sequências da COI obtidas apresentaram de 590 a 593 pb. Embora o tamanho das sequências tenha sido variável, as diferenças entre os morfotipos estudados não excedem 1% dos quase 600 nucleotídeos observados.

O resultado demonstrou variabilidade entre os morfotipos estudados quanto ao tamanho do fragmento COI apenas nos morfotipos M1 e M2 (município de Concepción) e M3 e M6 (município de Santa Rosa); enquanto a composição nucleotídica, apresentou variação em todos os morfotipos estudados. A composição nucleotídica apresentou limites de variação bastante próximos para ambas as populações de estudo (Tabelas 7 e 8). Os nucleotídeos timina e adenina foram os mais abundantes no fragmento da COI analisado para os diferentes morfotipos do complexo *fraterculus*, correspondendo em média a 69%, em cada população.

Na tabela 9, está representada a média da composição nucleotídica da região do COI de acordo com a posição no códon para os municípios de Concepción e Santa Rosa, respectivamente. Segundo Pereira et al. (2001) as taxas de substituição ao longo de uma sequência não são iguais em muitos casos. Um exemplo comum em sequências codificadoras de proteínas é que a terceira posição do códon tem taxas de substituição maiores do que a primeira e a segunda posições.

Tabela 7 – Composição nucleotídica média para as sequências da região do gene COI de espécimes do complexo *fraterculus*, do município de Concepción

Nucleotídeo	Frequência média (%)	Limite de variação (%)
T	37,4	37,2 – 37,7
C	15,9	15,7 – 16,2
A	31,7	31,4 – 31,9
G	14,9	14,8 – 15,2

Tabela 8 – Composição nucleotídica média para as sequências da região do gene COI de espécimes do complexo *fraterculus*, do município de Santa Rosa

Nucleotídeo	Frequência média (%)	Limite de variação (%)
T	37,6	37,5 – 38,3
C	15,8	15,2 – 16,0
A	31,5	31,4 – 31,8
G	14,9	14,8 – 15,0

Tabela 9 – Composição nucleotídica média para as sequências da região do gene COI de espécimes do complexo *fraterculus*, dos municípios de Concepción e Santa Rosa, de acordo com a posição do códon

Base	Frequência média (%) - Concepción			Frequência média (%) - Santa Rosa		
	1º	2º	3º	1º	2º	3º
T	41,3	29,2	41,7	30,3	41,0	41,5
C	5,1	16,7	26,0	17,6	24,3	5,6
A	52,4	26,3	16,3	25.8	19,3	49,6
G	1,0	27,8	15,8	26,3	15,2	3,0

Os resultados das análises de similaridade para a região da COI analisada foram calculados para os morfotipos do complexo *fraterculus* (Tabelas 10 e 11). Pela matriz de similaridade, foi possível determinar a proximidade genética dos espécimes e observar o elevado grau de proximidade para a região do gene COI entre os morfotipos para cada município estudado. Foram observados 16 haplótipos na população de Concepcion, os quais corresponderam a apenas três sequências protéicas distintas, enquanto a população de Santa Rosa apresentou 13 haplótipos, representando três sequências protéicas distintas, sendo que para cada população foram estudados seis morfotipos (Figuras 24 e 25). A herança materna - e a não recombinação entre as moléculas - faz com que um genótipo ou haplótipo mitocondrial possa servir para traçar uma genealogia materna, o que muitas vezes pode ajudar a entender o modo de dispersão de muitos organismos, acasalamentos preferenciais etc (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001).

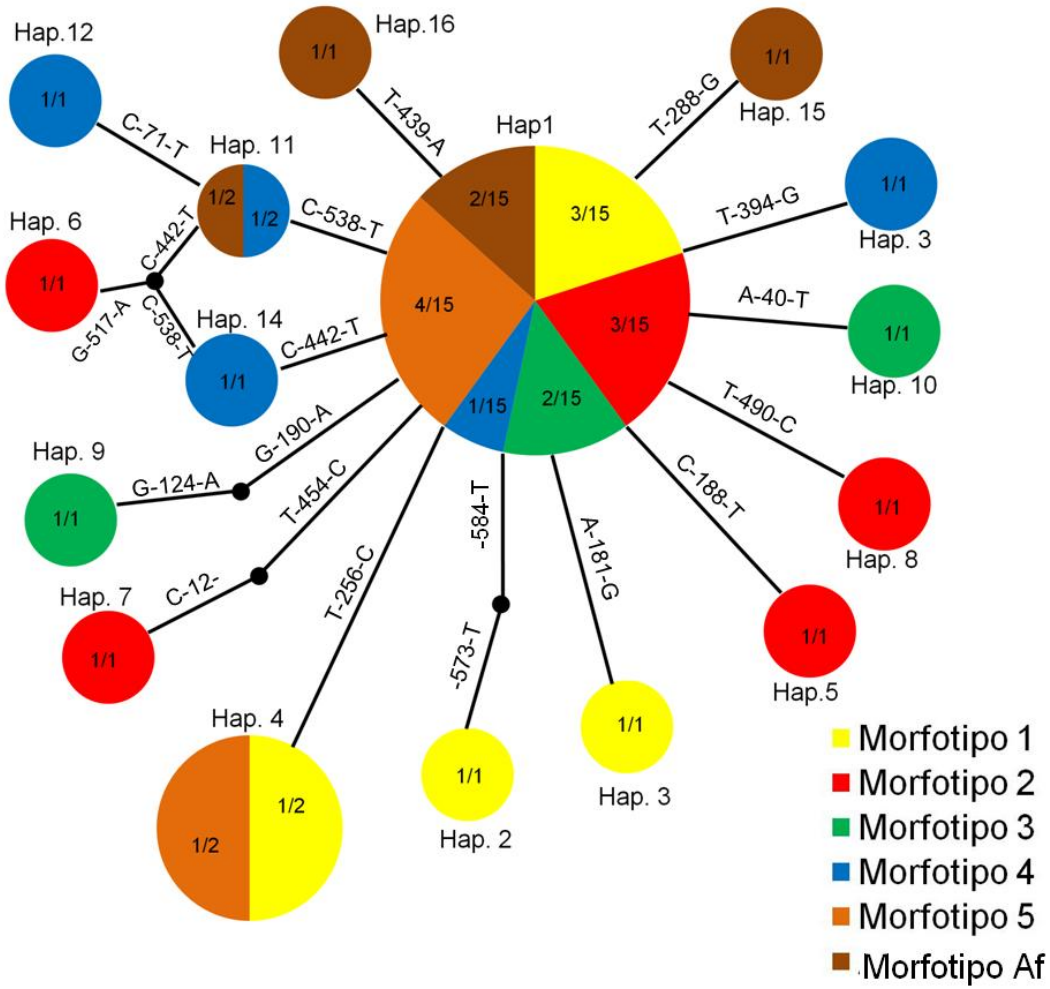


Figura 24 - Rede de haplótipos de DNA (COI) mostrando as inter-relações dos haplótipos dos morfotipos do complexo *fraterculus* no município de Concepción. Os pontos em cada traço representam a quantidade de mutações entre haplótipos e os valores indicam a posição em que a mutação ocorreu e qual base foi trocada. O tamanho e os números dentro do círculo indicam a quantidade de indivíduos que contêm cada haplótipo

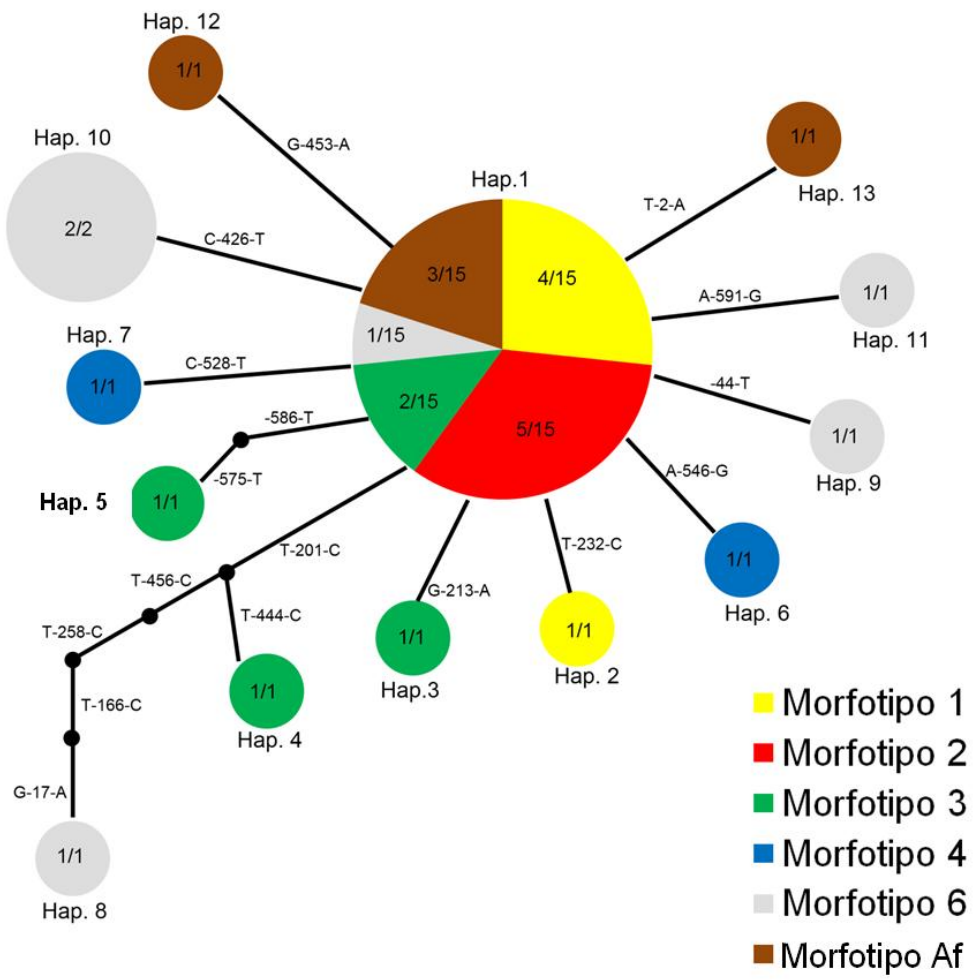


Figura 25 - Rede de haplótipos de DNA (COI) mostrando as inter-relações dos haplótipos dos morfotipos do complexo *fraterculus* no município de Santa Rosa. Os pontos em cada traço representam a quantidade de mutações entre haplótipos e os valores indicam a posição em que a mutação ocorreu e qual base foi trocada. O tamanho e os números dentro do círculo indicam a quantidade de indivíduos que contêm cada haplótipo

Tabela 10 – Matriz de similaridade genética da porção COI dos morfotipos do complexo *fraterculus* do município de Concepción – Paraguai

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1) 3.9C__M1	ID																															
2) 4.5C__M1	0.996	ID																														
3) 15.2C__M1	1.000	0.996	ID																													
4) 8.1C__M1	0.998	0.994	0.998	ID																												
5) 10.2C__M1	0.998	0.994	0.998	0.996	ID																											
6) 21C__M1	1.000	0.996	1.000	0.998	0.998	ID																										
7) 25.3C__M2	0.998	0.994	0.998	0.996	0.996	0.998	ID																									
8) 1C__M2	0.994	0.991	0.994	0.993	0.993	0.994	0.993	ID																								
9) 3.15C__M2	1.000	0.996	1.000	0.998	0.998	1.000	0.998	0.994	ID																							
10) 5C__M2	1.000	0.996	1.000	0.998	0.998	1.000	0.998	0.994	1.000	ID																						
11) 4.2C__M2	0.996	0.993	0.996	0.994	0.994	0.996	0.994	0.991	0.996	0.996	ID																					
12) 13.2C__M2	1.000	0.996	1.000	0.998	0.998	1.000	0.998	0.994	1.000	1.000	0.996	ID																				
13) 14.4C__M2	0.998	0.994	0.998	0.996	0.996	0.998	0.996	0.993	0.998	0.998	0.994	0.998	ID																			
14) 3.2C__M3	1.000	0.996	1.000	0.998	0.998	1.000	0.998	0.994	1.000	1.000	0.996	1.000	0.998	ID																		
15) 3.5C__M3	0.996	0.993	0.996	0.994	0.994	0.996	0.994	0.991	0.996	0.996	0.993	0.996	0.994	0.996	ID																	
16) 14.3C__M3	1.000	0.996	1.000	0.998	0.998	1.000	0.998	0.994	1.000	1.000	0.996	1.000	0.998	1.000	0.996	ID																
17) 3.4C__M3	0.998	0.994	0.998	0.996	0.996	0.998	0.996	0.993	0.998	0.998	0.994	0.998	0.996	0.998	0.994	0.998	ID															
18) 3.10C__M4	0.998	0.994	0.998	0.996	0.996	0.998	0.996	0.996	0.998	0.998	0.994	0.998	0.996	0.998	0.994	0.998	0.996	ID														
19) 9.1C__M4	0.996	0.993	0.996	0.994	0.994	0.996	0.994	0.994	0.996	0.996	0.993	0.996	0.994	0.996	0.993	0.996	0.994	0.998	ID													
20) 9.2C__M4	0.998	0.994	0.998	0.996	0.996	0.998	0.996	0.993	0.998	0.998	0.994	0.998	0.996	0.998	0.994	0.998	0.996	0.996	0.994	ID												
21) 11.2C__M4	0.998	0.994	0.998	0.996	0.996	0.998	0.996	0.996	0.998	0.998	0.994	0.998	0.996	0.998	0.994	0.998	0.996	0.996	0.994	0.996	ID											
22) 12.1C__M4	1.000	0.996	1.000	0.998	0.998	1.000	0.998	0.994	1.000	1.000	0.996	1.000	0.998	1.000	0.996	1.000	0.998	0.998	0.996	0.998	0.998	ID										
23) 19C__M5	1.000	0.996	1.000	0.998	0.998	1.000	0.998	0.994	1.000	1.000	0.996	1.000	0.998	1.000	0.996	1.000	0.998	0.998	0.996	0.998	0.998	1.000	ID									
24) 6C__M5	1.000	0.996	1.000	0.998	0.998	1.000	0.998	0.994	1.000	1.000	0.996	1.000	0.998	1.000	0.996	1.000	0.998	0.998	0.996	0.998	0.998	1.000	1.000	ID								
25) 12.2C__M5	1.000	0.996	1.000	0.998	0.998	1.000	0.998	0.994	1.000	1.000	0.996	1.000	0.998	1.000	0.996	1.000	0.998	0.998	0.996	0.998	0.998	1.000	1.000	1.000	ID							
26) 25.1C_M5	1.000	0.996	1.000	0.998	0.998	1.000	0.998	0.994	1.000	1.000	0.996	1.000	0.998	1.000	0.996	1.000	0.998	0.998	0.996	0.998	0.998	1.000	1.000	1.000	1.00(	ID						
27) 15.9C__M5	0.998	0.994	0.998	0.996	1.000	0.998	0.996	0.993	0.998	0.998	0.994	0.998	0.996	0.998	0.994	0.998	0.996	0.996	0.994	0.996	0.996	0.998	0.998	0.998	0.99(	0.998	ID					
28) 8CF1__Af	0.998	0.994	0.998	0.996	0.996	0.998	0.996	0.996	0.998	0.998	0.994	0.998	0.996	0.998	0.994	0.998	0.996	1.000	0.998	0.996	0.996	0.998	0.998	0.998	0.99(	0.998	0.996	ID				
29) 8CF2__Af	0.998	0.994	0.998	0.996	0.996	0.998	0.996	0.993	0.998	0.998	0.994	0.998	0.996	0.998	0.994	0.998	0.996	0.996	0.994	0.996	0.996	0.998	0.998	0.998	0.99(	0.998	0.996	0.996	ID			
30) 8CF7__Af	0.998	0.994	0.998	0.996	0.996	0.998	0.996	0.993	0.998	0.998	0.994	0.998	0.996	0.998	0.994	0.998	0.996	0.996	0.994	0.996	0.996	0.998	0.998	0.998	0.99(	0.998	0.996	0.996	0.996	ID		
31) 8CF8__Af	1.000	0.996	1.000	0.998	0.998	1.000	0.998	0.994	1.000	1.000	0.996	1.000	0.998	1.000	0.996	1.000	0.998	0.998	0.996	0.998	0.998	1.000	1.000	1.000	1.00(	1.000	0.998	0.998	0.998	0.998	ID	
32) 8CF9__Af	1.000	0.996	1.000	0.998	0.998	1.000	0.998	0.994	1.000	1.000	0.996	1.000	0.998	1.000	0.996	1.000	0.998	0.998	0.996	0.998	0.998	1.000	1.000	1.000	1.00(	1.000	0.998	0.998	0.998	0.998	1.000	ID

Tabela 11 – Matriz de similaridade genética da porção COI dos morfotipos do complexo *fraterculus* do município de Santa Rosa – Paraguai

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1) 22SR__M1	ID																											
2) 28SR__M1	1.000	ID																										
3) 31.2SR__M1	0.998	0.998	ID																									
4) 32.2SR__M1	1.000	1.000	0.998	ID																								
5) 47.2SR__M1	1.000	1.000	0.998	1.000	ID																							
6) 30.1SR__M2	1.000	1.000	0.998	1.000	1.000	ID																						
7) 26SR__M2	1.000	1.000	0.998	1.000	1.000	1.000	ID																					
8) 25SR__M2	1.000	1.000	0.998	1.000	1.000	1.000	1.000	ID																				
9) 36SR__M2	1.000	1.000	0.998	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	ID																			
10) 32.1SR__M2	1.000	1.000	0.998	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	ID																		
11) 8.1SR__M3	0.998	0.998	0.996	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	ID																	
12) 18.2SR__M3	1.000	1.000	0.998	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.998	ID																
13) 8.2SR__M3	0.996	0.996	0.994	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.994	0.996	ID															
14) 18.1SR__M3	1.000	1.000	0.998	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.998	1.000	0.996	ID														
15) 9SR__M3	0.996	0.996	0.994	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.994	0.996	0.993	0.996	ID													
16) 5SR__M4	0.998	0.998	0.996	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.996	0.998	0.994	0.998	0.994	ID												
17) 6SR__M4	0.998	0.998	0.996	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.996	0.998	0.994	0.998	0.994	0.996	ID											
18) 17.2SR__M6	1.000	1.000	0.998	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.998	1.000	0.996	1.000	0.996	0.998	0.998	ID										
19) 18.4SR__M6	0.991	0.991	0.989	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.989	0.991	0.991	0.991	0.988	0.989	0.989	0.991	ID									
20) 3.1SR__M6	0.998	0.998	0.996	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.996	0.998	0.994	0.998	0.994	0.996	0.996	0.998	0.989	ID								
21) 3.2SR__M6	0.998	0.998	0.996	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.996	0.998	0.994	0.998	0.994	0.996	0.996	0.998	0.989	0.996	ID							
22) 14.1SR__M6	0.998	0.998	0.996	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.996	0.998	0.994	0.998	0.994	0.996	0.996	0.998	0.989	0.996	0.996	ID						
23) 7SR__M6	0.998	0.998	0.996	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.996	0.998	0.994	0.998	0.994	0.996	0.996	0.998	0.989	0.996	1.000	0.996	ID					
24) SRF1__Af	0.998	0.998	0.996	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.996	0.998	0.994	0.998	0.994	0.996	0.996	0.998	0.989	0.996	0.996	0.996	0.996	ID				
25) SRF2__Af	1.000	1.000	0.998	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.998	1.000	0.996	1.000	0.996	0.998	0.998	1.000	0.991	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	ID			
26) SRF7__Af	0.998	0.998	0.996	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.996	0.998	0.994	0.998	0.994	0.996	0.996	0.998	0.989	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.998	ID		
27) SRF8__Af	1.000	1.000	0.998	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.998	1.000	0.996	1.000	0.996	0.998	0.998	1.000	0.991	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	1.000	0.998	ID	
28) SRF11__Af	1.000	1.000	0.998	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.998	1.000	0.996	1.000	0.996	0.998	0.998	1.000	0.991	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	1.000	0.998	1.000	ID

4.3.2 Região do ITS1

Foram obtidas 34 sequências para a região do ITS1, com 558 pb (Concepción) e 564 pb (Santa Rosa). Não houve diferença entre os morfotipos estudados quanto ao tamanho do fragmento ITS1, nem quanto à composição nucleotídica para ambas as populações estudadas. Prezotto (2008) analizou oito populações de *Anastrepha fraterculus* do sudeste do Brasil e obteve fragmentos de 900pb, não obtendo diferenças significativas quanto ao tamanho. Contudo, o tamanho do espaçador foi pouco variável nas amostras de *Anastrepha* sp. 1 aff. *fraterculus*, do Brasil e de outras regiões da América Latina. Nesse caso, não foi possível a distinção entre as entidades biológicas baseadas somente no tamanho do fragmento amplificado. De acordo com Basso *et al.* (2003), na Argentina existe apenas uma entidade de *A. fraterculus*, baseando-se no tamanho do fragmento de ITS1 amplificado (apesar de encontrarem polimorfismo nos cromossomos sexuais).

Neste estudo, a composição nucleotídica não apresentou variação e os valores foram bastante próximos para ambas as populações. No município de Concepción, os valores obtidos foram T (38,4%), C (9,5%), A (42,7%) e G (9,5%), e no município de Santa Rosa, T (38,3%), C (9,6%), A (42,4%) e G (9,8%). Os nucleotídeos timina e adenina foram os mais abundantes no fragmento do ITS1 analisado para os diferentes morfotipos do complexo *fraterculus* em ambas as populações, correspondendo cerca de 81%, para cada município estudado. A maior frequência de bases AT no ITS1 nas amostras do complexo *fraterculus* é semelhante àquela encontrada por Prezotto (2008), assim como nas amostras de *Ceratitis capitata* (78,76%) (DOUGLAS; HAYMER, 2001) e de espécies do gênero *Drosophila* (TAUTZ et al., 1988, SCHLÖTTERER et al., 1994). Segundo Tautz et al. (1988), essa alta concentração de bases AT seria decorrente de drásticas alterações na composição das bases na estrutura secundária do RNAr e da coevolução de mutações compensatórias. Além disso, segundo Schlötterer *et al.* (1994), a alta concentração de bases AT estaria relacionada ao fato dos genes de DNAr estarem localizados na heterocromatina, em geral, rica em AT. De modo similar, Goday et al. (2006) mostraram que em oito espécies de *Anastrepha*, incluindo quatro do complexo *fraterculus*, os genes ribossômicos também estão localizados em blocos heterocromáticos ricos em AT.

Os resultados das análises de similaridade para a região do ITS1 foram calculados para os espécimes do complexo *fraterculus* (Tabelas 12 e 13). Na matriz de similaridade foi

possível determinar a proximidade genética dos espécimes e observar sequências idênticas (100%) do ITS1 entre os morfotipos de cada município (Concepción e Santa Rosa), com exceção de um indivíduo em Concepción e dois em Santa Rosa, que apresentaram variação nucleotídica de 0,2 e 0,4%. Em nível intra-específico, envolvendo comparações entre indivíduos ou populações dentro da espécie, a sequência do ITS1 tende a ser extremamente similar para *Ceratitis capitata* (DOUGLAS; HAYMER, 2001). Prezotto (2008) estudou amostras populacionais de espécies do complexo *fraterculus* do Brasil e de outras localidades do Continente Americano e, de acordo com o autor, entre espécies de populações brasileiras a menor similaridade (0,897) foi observada entre as amostras de *Anastrepha* sp. 2 aff. *fraterculus* (IlhabelaSP) e *Anastrepha* sp. 1 aff. *fraterculus* (Botucatu/SP); o maior índice ocorreu entre as amostras de *Anastrepha* sp. 2 aff. *fraterculus* (Ilhabela/SP) e *Anastrepha* sp. 3 aff. *fraterculus* (Ubatuba/SP) e entre *Anastrepha* sp. 2 aff. *fraterculus* e *Anastrepha* sp. 3 aff. *fraterculus* ambas de Santa Isabel/SP. Tomando-se a similaridade média calculada entre as amostras de cada espécie, observa-se uma similaridade de 0,902 entre *Anastrepha* sp. 1 aff. *fraterculus* e *Anastrepha* sp. 2 aff. *fraterculus*, de 0,965 entre *Anastrepha* sp. 1 aff. *fraterculus* e *Anastrepha* sp. 3 aff. *fraterculus* e de 0,981 entre *Anastrepha* sp. 2 aff. *fraterculus* e *Anastrepha* sp. 3 aff. *fraterculus*. Com base nessas análises das entidades brasileiras do complexo, pode-se admitir que o nível de diferenças observadas no ITS1 deva refletir a existência de diferentes espécies dentro do complexo *fraterculus*. O autor sugere que podem existir até três entidades no México e uma entidade na Guatemala.

Ainda de acordo com Prezotto (2008), baseado nas seqüências do ITS1 das amostras estudadas até o momento, poderia existir mais de dez espécies no complexo *Anastrepha fraterculus*, contudo no presente trabalho, com base nos marcadores moleculares COI e ITS1 não há diferenças entre os morfotipos estudados em ambas as populações do Paraguai, ao contrário do que foi observado nas análises morfométricas.

Tabela 12 – Matriz de similaridade genética da porção ITS1 dos espécimes do complexo *fraterculus*, do município de Concepción – Paraguai

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1) 10.2C__M1	-													
2) 15.2C__M1	1.000	-												
3) 1C__M2	1.000	1.000	-											
4) 4.2C_M2	1.000	1.000	1.000	-										
5) 13.2C__M2	1.000	1.000	1.000	1.000	-									
6) 25.3C__M2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-								
7) 3.4C__M3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-							
8) 14.3C__M3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-						
9) 3.2C__M3	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	-					
10) 3.10C__M4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.998	-				
11) 11.2C__M4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.998	1.000	-			
12) 6C__M5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.998	1.000	1.000	-		
13) 8CF2__Af	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.998	1.000	1.000	1.000	-	
14) 8CF8__Af	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.998	1.000	1.000	1.000	1.000	-

Tabela 13 – Matriz de similaridade genética da porção ITS1 dos espécimes do complexo *fraterculus*, do município de Santa Rosa – Paraguai

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1) 22SR_M1	-																			
2) 28SR_M1	1.000	-																		
3) 31.2SR_M1	1.000	1.000	-																	
4) 47.2SR_M1	1.000	1.000	1.000	-																
5) 25SR_M2	1.000	1.000	1.000	1.000	-															
6) 30.1SR_M2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-														
7) 36SR_M2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-													
8) 8.1SR_M3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-												
9) 8.2SR_M3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-											
10) 9SR_M3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-										
11) 18.1SR_M3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-									
12) 5SR_M4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-								
13) 6SR_M4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-							
14) 3.1SR_M6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-						
15) 3.2SR_M6	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	-					
16) 7SR_M6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.996	-				
17) 17.2SR_M6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.996	1.000	-			
18) 18.4SR_M6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.996	1.000	1.000	-		
19) 14.1SR_M6	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	1.000	0.996	0.996	0.996	-	
20) SRF2 Af	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.996	1.000	1.000	1.000	0.996	-

5 CONCLUSÕES

- Há variações entre e dentro dos morfotipos, com base na análise morfométrica da asa e do acúleo do complexo *fraterculus* de Concepción e Santa Rosa, Paraguai.
- Os morfotipos das populações de Concepción e Santa Rosa não apresentam diferenças relevantes para os marcadores moleculares utilizados (COI e ITS1).
- Os espécimes com variações no ápice do acúleo não diferem, com base nos marcadores moleculares COI e ITS1, dos espécimes com acúleo típico do complexo *fraterculus* das populações de Concepción e Santa, Paraguai.

REFERÊNCIAS

ALBERTI, A.C.; CONFALONIERI, V.A.; ZANDOMENI, R.O.; VILARDI, J.C. Phylogeographic studies on natural populations of the South American fruit fly, Anastrepha fraterculus (Diptera: Tephritidae). **Genetica**, Dordrecht, v. 132, p. 1-8, 2008.

ALBERTI, A.C.; RODRIGUERO, M.S.; CENDRA, P.G.; SAIDMAN, B.O.; VILARDI, J.C. Evidence indicating that Argentine populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) belong to a single biological species. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 95, p. 505-512, 2002.

ALENCAR-SOUZA, J.M.G. **Caracterização de populações e espécies de moscas-das-frutas (Diptera: Tephridae) no Rio Grande do Norte, através de morfometria multivariada**. 1998. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1998.

ALJANABI, S.M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research,** Oxford, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.

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

AMARAL, P.M. **Estudo da variabilidade isozímica de sete locos em larvas de populações naturais de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae).** 1994. 74 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 1994.

ARIASM.C.; INFANTE-MALACHIAS, M.E. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos de DNA. In: MATIOLI, S.R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2001. p. 143-152.

ARIAS, O.R. **Espécies de moscas-ds-frutas do gênero *Anastrepha* Schiner, 1868 (Diptera: Tephritidae) coletadas nos estados de Concepción e Misiones, Paraguai**. 2010. 58 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

ARAUJO, E.L.; NASCIMENTO, F.M.; ZUCCHI, R.A. Utilização da análise discriminante em estudos taxonômicos de moscas-das-frutas do gênero *Anastepha* Schiner, 1868 (Diptera: Tephritidae). **Scientia Agricola,** Piracicaba, v. 55, n. 1, p. 105-110, 1998.

ARAUJO, E.L.; ZUCCHI, R.A. Medidas do acúleo na caracterização de cinco espécies de *Anastrepha* do grupo *fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 3, p. 329-337, 2006.

BARR, N.B.; CUI, L.; McPHERON, B.A. Molecular systematics of nuclear period in genus *Anastrepha* (Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 98, n. 2, p. 173-180, 2005.

BASSO, A.; SONVICO. A.; QUESADA-ALLUE, L.A.; MANSO, F. Karyotypic and molecular identification of laboratory stocks of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wied) (Diptera: Tephritidade). **Journal of Economic Entomology**, Columbus, v. 96, n. 4, p. 1237-1244, 2003.

BLACKITH, R. Morphometrics, In: WATERMAN, T.H.; MOROWITZ, J. (Ed.). **Theoretical and mathematical biology**. New York: Blaisdell, 1965. p. 225-249.

BOOKSTEIN, F.L. **Morphometric tools for landmark data:** geometry and biology. New York: Cambridge University Press, 1991. 435 p.

CAPOOR, V.N. Uma nova espécie do gênero *Anastrepha* (Diptera; Trypetidae). **Agronomia**, v. 12, n. 3/4, p. 213-215, 1954.

_____. Duas espécies novas do gênero *Anastrepha* (Diptera; Trypetidae). **Arquivos do Instituto Biológico,** São Paulo, v. 22, p. 23-30, 1955.

CANAL DAZA, N.A. **Levantamento, flutuação populacional e análise faunística das espécies de moscas-das-frutas (Diptera, Tephritidae) em quatro municípios do norte do estado de Minas Gerais.** 1997. 113 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz , Universidade de São Paulo**,** 1997.

CLEMENT, M., POSADA, D.; CRANDALL, K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, p. 1657-1660, 2000.

DOUGLAS, L.J.; HAYMER, D.S. Ribossomal ITS1 Polymorphisms in *Ceratitis capitata* and *Ceratitis rosa* (Diptera: Tephritidae). **Entomological Society of America**, Columbus, v. 94, n. 5, p. 726-731, 2001.

FRITZ, A.H.; SCHABLE, N. Microsatellite loci from the Caribbean fruit fy, *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). **Molecular Ecology Notes,** Oxford, v. 4: p. 443-445, 2004.

GODAY, C.; SELIVON, D.; PERONDINI, A.L.P.; GRECIANO, P.G.; RUIZ, M.F. Cytological characterization of sex chromosomes and ribosomal DNA localization in *Anastrepha* species (Diptera, Tephritidade). **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 114, p. 70-76, 2006.

HERNANDEZ-ORTIZ, V.; GOMEZ-ANAYA, J.A.; SANCHEZ, A.; McPHERON, B.A.; ALUJA, M. Morphometric analysis of Mexican and South American populations of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae) and recognition of a distinct Mexican morphotype. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 94, n. 6, p. 487-499. 2004.

HERNANDEZ-ORTIZ, V.; SELIVON, D.; BARTOLICCI, A.; MORALES-VALLES, P.; FRÍAS, D. The *Anastrepha fraterculus* species complex: recogtition of three morphotypes from Andean coutries using the multivariate approach. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FRUIT FLIES OF ECONOMIC IMPORTANCE, 8., 2010, Valencia. **Proceedings…** Valencia: Universidad de Valencia, 2010. p. 61.

HILLIS, D.H.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and Phylogenetic Inference. **The Quarterly Review of Biology**, New York, v.66, n.4, p.411-453, 1991.

HILLIS, D.H.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. **Molecular systematics**. Sunderland: Sinauer, 1996. 655 p.

JIE, Y.J.; XING, D.Z.; JUN, L.H. Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 3, p. 581–585, 2003.

LOXDALE, H.D.; LUSHAI, G. Molecular markers in entomology. **Bulletin of Entomological Research,** Farnham Royal, v. 88, p. 577-600, 1998.

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

MONTEIRO, L.R.; REIS, S.F. **Princípios de morfometria geométrica**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 1999. 188 p.

MORGANTE, J.S.; MALAVASI, A.; BUSH, G.L. Biochemical systematic and evolutionary relationships of Neotropical *Anastrepha*. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 73, p. 622-630, 1980.

NORRBOM, A. L.; R. A. ZUCCHI; HERNÁNDEZ-ORTIZ, V. Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotripanini) based on morphology. In: ALUJA, M.; NORRBOM, A.L. (Ed.). **Fruit flies (Tephritidae):** phylogeny and evolution of behavior. Boca Raton: CRC Press, 1999. p. 299–342.

PEREIRA, S.L.; MIYAKI, C.Y.; RUSSO, C.A.M. Reconstrução filogenética: métodos probabilísticos. In: MATIOLI, S.R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2001. p. 117-129.

PETIT-MARTY, N. **Estudios sobre comportamiento reproductivo de dos poblaciones silvestres de Anastrepha fraterculus (Diptera: Tephritidae) de Argentina**. 1999. Thesis (Graduate) - Universidad Nacional de Misiones, Argentina, 1999.

PETIT-MARTY, N.; VERA, M.T.; CALCAGNO, G.; CLADERA, J.L.; SEGURA, D.F.; ALLINGHI, A.; RODRIGUERO, M.; GÓMEZ CENDRA, P.; VISCARRET, M.M.; VILARDI, J.C. Sexual behavior and mating compatibility among four populations of *Anastrepha fraterculus*

(Diptera: Tephritidae) from Argentina. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 97, p. 1320-1327, 2004a.

PETIT-MARTY, N.; VERA, M.T.; CALCAGNO, G.; CLADERA, J.L.; VILARDI, J.C. Lack of post-mating isolation between two populations of *Anastrepha fraterculus* from different ecological regions in Argentina. In: INTERNATIONAL FRUIT FLY SYMPOSIUM, 6., 2004b, Stellenbosch, South Africa. **Proceedings…** p. 79-82.

PREZOTTO, L.F. **Análise do ITS1 do DNA ribossômico em espécies do complexo *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae).** 2008. 74 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Evolutiva) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

RODERICK, G.K. Geographical structure of insect populations: gene flow, phylogeography and their uses. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 41, p.325-352, Jan. 1996.

ROHLF, F.J. **Program tpsDig, version 1.40**: stony brook. New York: New York State University, Departament of Ecology and Evolution, 2004.

_____. **Program tpsUtil, version 1.38:** stony brook. New York: New York State University, Departament of Ecology and Evolution, 2006.

_____. **Program tpsRegr, version 1.33:** stony brook. New York: New York State University, Departament of Ecology and Evolution, 2007a.

_____. **Program tpsRewl, version 1.45**: stony brook. New York: New York State University, Departament of Ecology and Evolution, 2007b.

RUIZ-ARCE, R. **Phylogeography of *Anastrepha ludens* and *Anastrepha obliqua*.** 2009. 105 p. Thesis (PhD in Entomology) – Department of Entomology, The Pennsylvania State University, University Park, 2009.

SALLES, L.A.B. **Bioecologia e controle da mosca-das-frutas Sul-Americana**. Pelotas: EMBRAPA, CPACT, 1995. 58p.

_____. Moscas-das-frutas. **Cultivar HF**, Pelotas, n. 5, p. 10, dez. 2000/jan. 2001. Caderno Técnico.

SANTOS, P. dos; MATIOLI, S.R. Mitochondrial and ribosomal DNA variation in Brazilian populations of three Anastrepha species (Diptera: Tephritidae). In: MEETING OF THE WORKING GROUP ON FRUIT FIES OF THE WESTERN HEMISPHERE, 2., 1997, Viña del Mar. **Abstract...** Viña del Mar, 1997. p. 47.

SANTOS, P. dos; URAMOTO, K.; MATIOLI. R. Experimental hybridization among *Anastrepha* species (Diptera: Tephritidae): production and morphological characterization of F1 hybrids. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 94, n.5, p. 717-725, 2001.

SCHLÖTTERER, C.; HAUSER, M.T.; VON HAESELER, A.; TAUTZ, D. Comparative Evolutionary Analysis of rDNA ITS Region in *Drosophila*. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 11, n. 3, p. 513-522, 1994.

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

SELIVON, D.; PERONDINI, A.L.P. Espécies crípticas del complejo *Anastrepha fraterculus* en Brasil. In: HERNÁNDEZ-ORTIZ, V. (Ed.). **Moscas de la fruta en Latinoamérica (Diptera: Tephritidae):** diversidad, biología y manejo. México: S y G Ed., 2007. p. 101-118.

SELIVON, D.; PERONDINI, A.L.P.; MORGANTE, J.S. A genetic-morfological characterization of two cryptic species of *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera:, Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 98, p. 367-381, 2005.

SILVA, J.G. Estudos moleculares. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2000. p. 29-39.

SILVA, J.G.; BARR, N.B. Recent advances in molecular systematics of *Anastrepha* Schiner. fruit flies of economic importance: from basic to applied knowledge. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FRUIT FLIES OF ECONOMIC IMPORTANCE, 7., 2006, Salvador. **Proceedings…** Salvador, 2006. p. 13-28,

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**, Columbus, v. 87, p. 651-701, 1994.

SMITH-CALDAS, M.R.B.; McPHERON, B.A.; SILVA, J.G.; ZUCCHI, R.A. Phylogenetic relionships among species of the *fraterculus* group (Diptera: Tephritidae: *Anastrepha*) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, p. 565-573, 2001.

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

SOUZA, J.M.G.A.; GOUVEIA, M.; PERONDINI, A.L.P.; SELIVON, D. Asymmetry of frontal bristles and postocular setae in species and hybrids of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 1, p. 145-151, 2007.

STECK, G.J. Biochemical systematics and population genetic structure of Anastrepha fraterculus and related species (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 84, p. 10-28, 1991.

_____. Taxonomic status of *Anastrepha fraterculus*, In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY**. The South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Wied.)**: advances in artificial rearing, taxonomic status and biological studies. Vienna, 1999. p. 13-20. (IAEA-TECDOC, 1064).

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

STEYSKAL, G.C. **Pictorial key to species of the genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae)**. Washington: The Entomological Society of Washington, 1977. 35 p.

STONE, A. **The fruit flies of the genus *Anastrepha***. Washington: U.S. Dept. Agric., Animal and Plant Health Inspection Service, Plant Protection and Quarentine, 1942. 439 p. (Publication, 439).

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, Aug. 2007.

TAUTZ, D.; HANCOCK, J.M. WEBB, D.A.; TAUTZ, C.; DOVER, G. Complete sequence of the rDNA genes of *Drosophila melanogaster*. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 5, n. 4, p. 366-376, 1988.

TEMPLETON, A.R.; CRANDALL, K.A.; SING, C. A. cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics**, Amsterdam, v. 132, p. 619-633, 1992.

VERA, M.T.; WILLINK, E. Moscas de los frutos de importancia económica en la provincia de Tucumán. In: ESTACIÓN EXPERIMENTAL AGROINDUSTRIAL OBISPO COLOMBRES**. Moscas de los frutos y su relevancia cuarentenaria en la citricultura del noroeste de Argentina.** Tucumán, 2007. p. 1-6.

VERA, T.M; CÁCERES, C.; WORNOAYPORN, V.; ISLAM, A.; ROBINSON, A.S.; VEGA, M.H. DE LA; HENDRICHS, J.; CAYOL, JEAN-PIERRE. Mating incompatibility among populations of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 99, n. 2, p. 387-397, 2006.

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

ZUCCHI, R.A. **Taxonomia das espécies de *Anastrepha* Schiner, 1968 do complexo *fraterculus* (Diptera, Tephitidae).** Piracicaba, 1977. 63 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1977.

_____. *Anastrepha* Schiner, 1868 (Diptera, Tephritidae): novas sinonimias. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 25, n. 4, p. 289-294, 1981.

_____. Taxonomia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2000. p. 13-24.

_____. **Fruit flies in Brazil:** *Anastrepha* species and their hosts plants. 2008. Disponível em: <www.lea.esalq.usp.br/anastrepha/>. Acesso em: 21 nov. 2010.

ZUCCHI, R.A.; ARAUJO, E.L.; CANAL D., N.A., UCHOA F., M.A. La mosca sudamericana de las frutas, *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) em el Brasil. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY**. The South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Wied.)**: advances in artificial rearing, taxonomic status and biological studies. Vienna, 1999. p. 5–12. (IAEA-TECDOC, 1064)..

ANEXOS

Alinhamento CustalW2 das sequências da região da COI de espécimes do complexo *fraterculus* do município de Concepción, Paraguai.

```
                    10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
3.9C__M1            TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
4.5C__M1            TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
15.2C__M1           TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
8.1C__M1            TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
10.2C__M1           TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
21C__M1             TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
25.3C__M2           TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
1C__M2              TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
3.15C__M2           TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
5C__M2              TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
4.2C__M2            TGATTAGTTCCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
13.2C__M2           TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
14.4C__M2           TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
3.2C__M3            TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
3.5C__M3            TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
14.3C__M3           TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
3.4C__M3            TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCTTTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
3.10C__M4           TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
9.1C__M4            TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGACTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
9.2C__M4            TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
11.2C__M4           TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
12.1C__M4           TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
19C__M5             TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
6C__M5              TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
12.2C__M5           TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
25.1C_M5            TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
15.9C__M5           TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
8CF1__Af            TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
8CF2__Af            TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
8CF7__Af            TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
8CF8__Af            TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA
8CF9__Af            TGATTAGTTCC - TTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTACTA

                    110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
3.9C__M1            GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
4.5C__M1            GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
```

```
15.2C__M1     GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
8.1C__M1      GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGGGCTTCAGTAGATTTAGCCA
10.2C__M1     GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
21C__M1       GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
25.3C__M2     GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCTA
1C__M2        GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
3.15C__M2     GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
5C__M2        GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
4.2C__M2      GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
13.2C__M2     GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
14.4C__M2     GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
3.2C__M3      GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
3.5C__M3      GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGGGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTGGATTTAGCCA
14.3C__M3     GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
3.4C__M3      GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
3.10C__M4     GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
9.1C__M4      GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
9.2C__M4      GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
11.2C__M4     GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
12.1C__M4     GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
19C__M5       GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
6C__M5        GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
12.2C__M5     GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
25.1C_M5      GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
15.9C__M5     GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
8CF1__Af      GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
8CF2__Af      GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
8CF7__Af      GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
8CF8__Af      GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA
8CF9__Af      GTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGCCA

                     210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
              ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
3.9C__M1      TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
4.5C__M1      TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
15.2C__M1     TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
8.1C__M1      TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
10.2C__M1     TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
21C__M1       TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
25.3C__M2     TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
1C__M2        TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
3.15C__M2     TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
5C__M2        TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
4.2C__M2      TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
13.2C__M2     TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
14.4C__M2     TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
3.2C__M3      TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
```

```
3.5C__M3      TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
14.3C__M3     TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
3.4C__M3      TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
3.10C__M4     TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
9.1C__M4      TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
9.2C__M4      TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
11.2C__M4     TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
12.1C__M4     TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
19C__M5       TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
6C__M5        TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
12.2C__M5     TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
25.1C_M5      TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
15.9C__M5     TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
8CF1__Af      TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
8CF2__Af      TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGGATAACATTTGATCG
8CF7__Af      TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
8CF8__Af      TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG
8CF9__Af      TTTTTTCATTACATTTAGCTGGAATTTCATCAATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAGTAATTAATATACGATCTACTGGTATAACATTTGATCG

                       310       320       330       340       350       360       370       380       390       400
              ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
3.9C__M1      AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
4.5C__M1      AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
15.2C__M1     AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
8.1C__M1      AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
10.2C__M1     AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
21C__M1       AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
25.3C__M2     AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
1C__M2        AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
3.15C__M2     AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
5C__M2        AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
4.2C__M2      AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
13.2C__M2     AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
14.4C__M2     AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
3.2C__M3      AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
3.5C__M3      AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
14.3C__M3     AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
3.4C__M3      AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
3.10C__M4     AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
9.1C__M4      AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
9.2C__M4      AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACCGACCGA
11.2C__M4     AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
12.1C__M4     AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
19C__M5       AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
6C__M5        AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
12.2C__M5     AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
25.1C_M5      AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
15.9C__M5     AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
```

```
8CF1__Af     AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
8CF2__Af     AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
8CF7__Af     AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
8CF8__Af     AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA
8CF9__Af     AATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACCGA

                      410       420       430       440       450       460       470       480       490       500
             ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
3.9C__M1     AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
4.5C__M1     AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
15.2C__M1    AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
8.1C__M1     AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
10.2C__M1    AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
21C__M1      AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
25.3C__M2    AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
1C__M2       AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGACCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
3.15C__M2    AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
5C__M2       AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
4.2C__M2     AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
13.2C__M2    AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
14.4C__M2    AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTCTATATTCTAA
3.2C__M3     AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
3.5C__M3     AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
14.3C__M3    AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
3.4C__M3     AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
3.10C__M4    AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
9.1C__M4     AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
9.2C__M4     AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
11.2C__M4    AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGACCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
12.1C__M4    AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
19C__M5      AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
6C__M5       AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
12.2C__M5    AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
25.1C_M5     AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
15.9C__M5    AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
8CF1__Af     AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
8CF2__Af     AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
8CF7__Af     AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGTGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
8CF8__Af     AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
8CF9__Af     AACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCTAA
```

```
                 510       520       530       540       550       560       570       580       590
                 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|...
3.9C__M1         TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
4.5C__M1         TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTT -AGGAATAATT - ATGCAATAA
15.2C__M1        TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
8.1C__M1         TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
10.2C__M1        TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
21C__M1          TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
25.3C__M2        TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
1C__M2           TTTTACCTGGATTTGGGATAATTTCTCATATTATTAGCCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
3.15C__M2        TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
5C__M2           TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
4.2C__M2         TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
13.2C__M2        TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
14.4C__M2        TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
3.2C__M3         TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
3.5C__M3         TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
14.3C__M3        TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
3.4C__M3         TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
3.10C__M4        TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGCCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
9.1C__M4         TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGCCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
9.2C__M4         TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
11.2C__M4        TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
12.1C__M4        TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
19C__M5          TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
6C__M5           TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
12.2C__M5        TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
25.1C_M5         TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
15.9C__M5        TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
8CF1__Af         TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGCCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
8CF2__Af         TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
8CF7__Af         TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
8CF8__Af         TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
8CF9__Af         TTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAA
```

Alinhamento CustalW2 das sequências da região da COI de espécimes do complexo *fraterculus* do município de Santa Rosa, Paraguai.

```
                    10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
22SR__M1            ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
28SR__M1            ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
31.2SR__M1          ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
32.2SR__M1          ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
47.2SR__M1          ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
30.1SR__M2          ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
26SR__M2            ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
25SR__M2            ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
36SR__M2            ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
32.1SR__M2          ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
8.1SR__M3           ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
18.2SR__M3          ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
8.2SR__M3           ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
18.1SR__M3          ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
9SR__M3             ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
5SR__M4             ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
6SR__M4             ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
17.2SR__M6          ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
18.4SR__M6          ATTGATTAGTTCCTTTGATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
3.1SR__M6           ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATTTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
3.2SR__M6           ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
14.1SR__M6          ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
7SR__M6             ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
SRF1__Af            ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
SRF2__Af            ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
SRF7__Af            AATGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
SRF8__Af            ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC
SRF11__Af           ATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATAGCATT - CCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACACTATTAC

                    110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
22SR__M1            TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
28SR__M1            TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
31.2SR__M1          TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
32.2SR__M1          TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
47.2SR__M1          TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
30.1SR__M2          TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
26SR__M2            TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
```

```
25SR__M2     TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
36SR__M2     TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
32.1SR__M2   TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
8.1SR__M3    TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
18.2SR__M3   TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
8.2SR__M3    TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
18.1SR__M3   TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
9SR__M3      TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
5SR__M4      TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
6SR__M4      TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
17.2SR__M6   TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
18.4SR__M6   TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTTTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
3.1SR__M6    TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
3.2SR__M6    TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
14.1SR__M6   TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
7SR__M6      TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
SRF1__Af     TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
SRF2__Af     TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
SRF7__Af     TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
SRF8__Af     TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC
SRF11__Af    TAGTAAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACTGTTTATCCTCCATTATCATCTCTAATCGCTCATGGAGGAGCTTCAGTAGATTTAGC

                      210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
             ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
22SR__M1     CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
28SR__M1     CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
31.2SR__M1   CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
32.2SR__M1   CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
47.2SR__M1   CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
30.1SR__M2   CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
26SR__M2     CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
25SR__M2     CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
36SR__M2     CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
32.1SR__M2   CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
8.1SR__M3    CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
18.2SR__M3   CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
8.2SR__M3    CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
18.1SR__M3   CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
9SR__M3      CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
5SR__M4      CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
6SR__M4      CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
17.2SR__M6   CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
18.4SR__M6   CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
3.1SR__M6    CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
3.2SR__M6    CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
14.1SR__M6   CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
7SR__M6      CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
```

```
SRF1__Af      CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
SRF2__Af      CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
SRF7__Af      CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
SRF8__Af      CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
SRF11__Af     CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC

                        310       320       330       340       350       360       370       380       390       400
              ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
22SR__M1      CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
28SR__M1      CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
31.2SR__M1    CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
32.2SR__M1    CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
47.2SR__M1    CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
30.1SR__M2    CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
26SR__M2      CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
25SR__M2      CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
36SR__M2      CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
32.1SR__M2    CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
8.1SR__M3     CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
18.2SR__M3    CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
8.2SR__M3     CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
18.1SR__M3    CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
9SR__M3       CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
5SR__M4       CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
6SR__M4       CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
17.2SR__M6    CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
18.4SR__M6    CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
3.1SR__M6     CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
3.2SR__M6     CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
14.1SR__M6    CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
7SR__M6       CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
SRF1__Af      CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
SRF2__Af      CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
SRF7__Af      CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
SRF8__Af      CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC
SRF11__Af     CGAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTATTAACAGCACTATTATTACTTTTATCTTTACCAGTACTAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACTGACC

                        410       420       430       440       450       460       470       480       490       500
              ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
22SR__M1      GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
28SR__M1      GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
31.2SR__M1    GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
32.2SR__M1    GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
```

```
47.2SR__M1     GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
30.1SR__M2     GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
26SR__M2       GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
25SR__M2       GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
36SR__M2       GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
32.1SR__M2     GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
8.1SR__M3      GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
18.2SR__M3     GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
8.2SR__M3      GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGACCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
18.1SR__M3     GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
9SR__M3        GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
5SR__M4        GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
6SR__M4        GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
17.2SR__M6     GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
18.4SR__M6     GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
3.1SR__M6      GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
3.2SR__M6      GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGACCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
14.1SR__M6     GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
7SR__M6        GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGACCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
SRF1__Af       GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTGTACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
SRF2__Af       GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
SRF7__Af       GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
SRF8__Af       GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
SRF11__Af      GAAACTTAAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTCT
```

```
                510       520       530       540       550       560       570       580       590
               ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|...
22SR__M1       AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT
28SR__M1       AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT
31.2SR__M1     AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT
32.2SR__M1     AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT
47.2SR__M1     AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT
30.1SR__M2     AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT
26SR__M2       AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT
25SR__M2       AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT
36SR__M2       AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT
32.1SR__M2     AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT
8.1SR__M3      AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT
18.2SR__M3     AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT
8.2SR__M3      AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT
18.1SR__M3     AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT
9SR__M3        AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTT -AGGAATAATT - ATGCAAT
```

5SR__M4	**AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAGTCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT**
6SR__M4	**AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCCCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT**
17.2SR__M6	**AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT**
18.4SR__M6	**AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT**
3.1SR__M6	**AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT**
3.2SR__M6	**AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT**
14.1SR__M6	**AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCGAT**
7SR__M6	**AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT**
SRF1__Af	**AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT**
SRF2__Af	**AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT**
SRF7__Af	**AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT**
SRF8__Af	**AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT**
SRF11__Af	**AATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAGAATCAGGTAAAAAGGAAACATTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAAT**

Alinhamento CustalW2 das sequências da região ITS1 de espécimes do complexo *fraterculus* do município de Concepción, Paraguai.

```
                    10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
10.2C__M1           AAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATA
15.2C__M1           AAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATA
1C__M2              AAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATA
4.2C_M2             AAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATA
13.2C__M2           AAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATA
25.3C__M2           AAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATA
3.4C__M3            AAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATA
14.3C__M3           AAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATA
3.2C__M3            AAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATA
3.10C__M4           AAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATA
11.2C__M4           AAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATA
6C__M5              AAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATA
8CF2__Af            AAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATA
8CF8__Af            AAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATA

                   110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
10.2C__M1           TTAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCA
15.2C__M1           TTAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCA
1C__M2              TTAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCA
4.2C_M2             TTAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCA
13.2C__M2           TTAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCA
25.3C__M2           TTAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCA
3.4C__M3            TTAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCA
14.3C__M3           TTAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCA
3.2C__M3            TTAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCA
3.10C__M4           TTAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCA
11.2C__M4           TTAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCA
6C__M5              TTAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCA
8CF2__Af            TTAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCA
8CF8__Af            TTAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCA
```

```
                    210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
10.2C__M1           CATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGT
15.2C__M1           CATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGT
1C__M2              CATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGT
4.2C_M2             CATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGT
13.2C__M2           CATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGT
25.3C__M2           CATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGT
3.4C__M3            CATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGT
14.3C__M3           CATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGT
3.2C__M3            CATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGT
3.10C__M4           CATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGT
11.2C__M4           CATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGT
6C__M5              CATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGT
8CF2__Af            CATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGT
8CF8__Af            CATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGT
```

```
                    310       320       330       340       350       360       370       380       390       400
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
10.2C__M1           GAATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAA
15.2C__M1           GAATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAA
1C__M2              GAATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAA
4.2C_M2             GAATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAA
13.2C__M2           GAATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAA
25.3C__M2           GAATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAA
3.4C__M3            GAATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAA
14.3C__M3           GAATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAA
3.2C__M3            GAATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAA
3.10C__M4           GAATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAA
11.2C__M4           GAATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAA
6C__M5              GAATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAA
8CF2__Af            GAATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAA
8CF8__Af            GAATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAA
```

```
                 410       420       430       440       450       460       470       480       490       500
                 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
10.2C__M1        AGAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAA
15.2C__M1        AGAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAA
1C__M2           AGAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAA
4.2C_M2          AGAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAA
13.2C__M2        AGAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAA
25.3C__M2        AGAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAA
3.4C__M3         AGAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAA
14.3C__M3        AGAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAA
3.2C__M3         AGAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAA
3.10C__M4        AGAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAA
11.2C__M4        AGAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAA
6C__M5           AGAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAA
8CF2__Af         AGAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAA
8CF8__Af         AGAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAA
```

```
                 510       520       530       540       550       560
                 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|..
10.2C__M1        TAAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAT- C
15.2C__M1        TAAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAATC
1C__M2           TAAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
4.2C_M2          TAAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
13.2C__M2        TAAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
25.3C__M2        TAAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
3.4C__M3         TAAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
14.3C__M3        TAAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
3.2C__M3         TAAAAAAATCCTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAA- C
3.10C__M4        TAAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
11.2C__M4        TAAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
6C__M5           TAAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
8CF2__Af         TAAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
8CF8__Af         TAAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
```

Alinhamento CustalW2 das sequências da região ITS1 de espécimes do complexo *fraterculus* do município de Santa Rosa, Paraguai.

```
                    10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
22SR__M1            AAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATAT
28SR__M1            AAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATAT
31.2SR__M1          AAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATAT
47.2SR__M1          AAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATAT
25SR__M2            AAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATAT
30.1SR__M2          AAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATAT
36SR__M2            AAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATAT
8.1SR__M3           AAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATAT
8.2SR__M3           AAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATAT
9SR__M3             AAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATAT
18.1SR__M3          AAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATAT
5SR__M4             AAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATAT
6SR__M4             AAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATAT
3.1SR__M6           AAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATAT
3.2SR__M6           ATAAAAAAAAAGAAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATAT
7SR__M6             AAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATAT
17.2SR__M6          AAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATAT
18.4SR__M6          AAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATAT
14.1SR__M6          AAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATAT
SRF2__Af            AAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAATTCATATTCTTTTTATTCTTTTTCATTCAATTTGTTATCCATCAATTATATCATAT

                   110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
22SR__M1            TAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCAC
28SR__M1            TAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCAC
31.2SR__M1          TAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCAC
47.2SR__M1          TAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCAC
25SR__M2            TAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCAC
30.1SR__M2          TAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCAC
36SR__M2            TAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCAC
8.1SR__M3           TAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCAC
8.2SR__M3           TAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCAC
9SR__M3             TAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCAC
18.1SR__M3          TAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCAC
5SR__M4             TAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCAC
6SR__M4             TAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCAC
3.1SR__M6           TAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCAC
```

```
3.2SR__M6     TAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCAC
7SR__M6       TAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCAC
17.2SR__M6    TAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCAC
18.4SR__M6    TAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCAC
14.1SR__M6    TAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCAC
SRF2__Af      TAAATATAATATGATGGTACATTTTGTAATGTTTTTTCTTATTTTTTCTTTTAAAAACCTTTAAACATGAAAATAAAAAGTTGTACTTATTATTCATCAC

                        210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
              ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
22SR__M1      ATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGTG
28SR__M1      ATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGTG
31.2SR__M1    ATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGTG
47.2SR__M1    ATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGTG
25SR__M2      ATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGTG
30.1SR__M2    ATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGTG
36SR__M2      ATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGTG
8.1SR__M3     ATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGTG
8.2SR__M3     ATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGTG
9SR__M3       ATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGTG
9SR__M3       ATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGTG
18.1SR__M3    ATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGTG
5SR__M4       ATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGTG
6SR__M4       ATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGTG
3.1SR__M6     ATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGTG
3.2SR__M6     ATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGTG
7SR__M6       ATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGTG
17.2SR__M6    ATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGTG
18.4SR__M6    ATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGTG
14.1SR__M6    ATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGTG
SRF2__Af      ATATATTTGATTGAATGATAAGTTAATTTGTTCACAATAACAAAAGCGGTATATATTTATTATTATTATACATAAAATGATTAGAAAATACAAAATAGTG

                        310       320       330       340       350       360       370       380       390       400
              ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
22SR__M1      AATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAAA
28SR__M1      AATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAAA
31.2SR__M1    AATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAAA
47.2SR__M1    AATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAAA
25SR__M2      AATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAAA
30.1SR__M2    AATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAAA
36SR__M2      AATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAAA
```

```
8.1SR__M3      AATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAAA
8.2SR__M3      AATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAAA
9SR__M3        AATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAAA
18.1SR__M3     AATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAAA
5SR__M4        AATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAAA
6SR__M4        AATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAAA
3.1SR__M6      AATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAAA
3.2SR__M6      AATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAAA
7SR__M6        AATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAAA
17.2SR__M6     AATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAAA
18.4SR__M6     AATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAAA
14.1SR__M6     AATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAAA
SRF2__Af       AATCATAATAAATACCACCACTGTATTATTGTTGAACTAAGACATTCGCAACTTAATAAAAATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATATATTATTGAAA
```

```
                410       420       430       440       450       460       470       480       490       500
               ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
22SR__M1       GAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAAT
28SR__M1       GAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAAT
31.2SR__M1     GAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAAT
47.2SR__M1     GAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAAT
25SR__M2 G     GAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAAT
30.1SR__M2     GAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAAT
36SR__M2 G     GAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAAT
8.1SR__M3      GAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAAT
8.2SR__M3      GAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAAT
9SR__M3        GAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAAT
18.1SR__M3     GAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAAT
5SR__M4        GAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAAT
6SR__M4        GAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAAT
3.1SR__M6      GAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAAT
3.2SR__M6      GAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAAT
7SR__M6        GAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAAT
17.2SR__M6     GAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAAT
18.4SR__M6     GAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAAT
14.1SR__M6     GAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAAT
SRF2__Af       GAAAATCAATTTATATATTATTATTATTATTATTTAATTTTACTCTTTCAATTAATATATGCAAAAAAAAATTGACATTTGTTATAAATAAAAAATAAAT
```

```
                    510       520       530       540       550       560
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|..
22SR__M1            AAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
28SR__M1            AAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
31.2SR__M1          AAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
47.2SR__M1          AAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
25SR__M2            AAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
30.1SR__M2          AAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
36SR__M2 G          AAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
8.1SR__M3           AAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
8.2SR__M3           AAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
9SR__M3             AAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
18.1SR__M3          AAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
5SR__M4             AAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
6SR__M4             AAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
3.1SR__M6           AAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
3.2SR__M6           AAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
7SR__M6             AAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
17.2SR__M6          AAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
18.4SR__M6          AAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
14.1SR__M6          AAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
SRF2__Af            AAAAAAATACTCTAAGCGGTGGATCACTTGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAAC
```