**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Caracterização morfométrica e molecular de *Anastrepha bistrigata*
Bezzi e *Anastrepha striata* Schiner (Diptera: Tephritidae)**

Tibério Graco Araújo da Silva

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

Piracicaba

2008

Tibério Graco Araújo da Silva
Biólogo

**Caracterização morfométrica e molecular de *Anastrepha bistrigata* Bezzi e
Anastrepha striata Schiner (Diptera: Tephritidae)**

Orientador:
Prof. Dr. FERNANDO LUIS CÔNSOLI

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

Piracicaba
2008

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

Silva, Tibério Graco Araújo da

Caracterização morfométrica e molecular de *Anastrepha bistrigata* Bezzi e *Anastrepha striata* Schiner (Diptera: Tephritidae) / Tibério Graco Araújo da Silva. - - Piracicaba, 2008.
65 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Genética molecular 2. Morfometria 3. Mosca-das-frutas 4. Zoologia (Classificação)
I. Título

CDD 632.774
S586c

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

**Dedico a meus pais, minha família e a
todos que, simplesmente por acreditarem,
me trouxeram até aqui**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Luis CÔnsoli, por todos os incentivos e ensinamentos passados como professor e orientador além do exemplo profissional que sempre me demonstrou. Agradeço ainda pela confiança depositada em mim, sem a qual a realização desse trabalho seria impossível;

Ao Prof. Dr. Roberto Antonio Zucchi, pelos diversos ensinamentos, pela sua colaboração, e auxílio no desenvolvimento da pesquisa, desde sua idealização e obtenção das amostras até as correções finais;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), por me dar a oportunidade de cursar a pós-graduação;

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos;

Aos pesquisadores Elizabeth Quisbeth Ramos, Keiko Uramoto, Miguel Francisco de Souza Filho, Marisol Giraldo Jaramillo e Valquiria da Rocha Campos Veloso, que gentilmente cederam suas amostras, possibilitando a realização desse estudo;

A Dra. Marinéia de Lara Haddad, pelo auxílio e apoio na realização das análises estatísticas;

Aos professores do Setor de Entomologia por todos os ensinamentos passados, seja em disciplinas cursadas, seja na convivência diária, que muito contribuíram para minha formação;

A todos os funcionários do Setor de Entomologia, por serem solícitos e prestativos sempre que precisei;

À Doutoranda Cláudia Fidélis Marinho, pela ajuda e primeiros ensinamentos nos procedimentos práticos dos estudos moleculares;

À aluna de iniciação científica Aline Sartori Guidolin, pelas inúmeras ocasiões de apoio e auxílio inestimáveis nas práticas e análises moleculares, sem os quais a realização das mesmas seria dificultada;

A todos os companheiros do Laboratório, pelo apoio incondicional e auxílio em geral no andamento das pesquisas, que nunca deixaram de prestar. Agradeço ainda pela amizade e convivência inigualáveis, que fazia o dia-a-dia no laboratório mais prazeroso;

Aos meus colegas das turmas da pós-graduação em Entomologia que fizeram a rotina do curso mais agradável, além da ajuda e experiências trocadas nas disciplinas cursadas.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Morfometria	12
2.2 Taxonomia molecular	15
2.3 Espécies estudadas	20
2.3.1 <i>Anastrepha striata</i> Schiner	20
2.3.2 <i>Anastrepha bistrigata</i> Bezzi	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Obtenção dos exemplares.....	23
3.2 Análise morfométrica.....	23
3.3 Análise molecular	26
3.3.1 Extração do DNA genômico	26
3.3.2 Amplificação da região da Citocromo Oxidase I.....	27
3.3.3 Clonagem e Sequenciamento	28
3.3.4 Alinhamento e análise das sequências	29
3.3.5 Códigos adotados	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1 Análise morfométrica em <i>Anastrepha striata</i> Schiner.....	32
4.1.1 Morfometria do acúleo.....	32
4.1.2 Morfometria da asa	35
4.2 Análise morfométrica em <i>Anastrepha bistrigata</i> Schiner	41
4.2.1 Morfometria do acúleo.....	41
4.2.2 Morfometria da asa	41
4.3 Simpatria em Goiás.....	45
4.4 Análises moleculares	49
4.4.1 Diversidade genética em <i>Anastrepha striata</i> Schiner	49
4.5 Desenvolvimento de iniciadores espécie-específicos.....	55

5 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS.....	59

RESUMO

Caracterização morfométrica e molecular de *Anastrepha bistrigata* Bezzi e *Anastrepha striata* Schiner (Diptera: Tephritidae)

Considerando-se a semelhança morfológica e ocorrência simpátrica de *Anastrepha striata* Schiner e *Anastrepha bistrigata* Bezzi, este trabalho propôs identificar formas para melhor caracterizá-las através de análises morfométricas do acúleo e asas de populações simpátricas e alopátricas dessas espécies, e molecular, por meio da análise de seqüências parciais do gene da citocromo oxidase I (COI). O trabalho também teve por objetivo desenvolver iniciadores espécie-específicos que possam vir a ser utilizados em estudos ecológicos em regiões em que ambas as espécies ocorram simpatricamente. As populações analisadas – *A. striata* (seis populações) e *A. bistrigata* (duas populações) foram provenientes de diferentes regiões do Brasil, Colômbia e Bolívia. Para os estudos morfométricos, os acúleos e asas foram montados em lâminas para captura e análise de imagens com auxílio de câmera fotográfica acoplada ao microscópio estereoscópico, utilizando-se de software apropriado. Foram traçados e mensurados oito segmentos no acúleo e 16 na asa direita de cada indivíduo, obtendo-se assim as medidas nas quais se basearam as análises. Nos estudos moleculares, os produtos de amplificação obtidos para a COI foram seqüenciados e analisados para o estudo da caracterização molecular das diferentes populações desses insetos e desenvolvimento de iniciadores espécie-específicos. Os resultados indicam a existência clara de distinção morfométrica entre as duas espécies e confirmaram as identificações baseadas na largura e comprimento do acúleo. Os dados morfométricos mostraram também a ausência de padrões geográficos distintos entre as populações de *A. striata* e *A. bistrigata*. *A. striata* apresentou maior variação morfométrica entre suas populações quando comparada à diferenciação encontrada para *A. bistrigata*. Nas duas espécies, populações encontradas em maiores altitudes apresentaram maiores dimensões. A análise de nucleotídeos da seqüência da COI obtida para as populações de *A. striata* em questão indicou a ocorrência de alta similaridade entre as mesmas. As análises realizadas também indicaram que a divergência genética encontrada no fragmento da COI analisado para as diferentes populações de *A. striata* não permitiu o agrupamento de acordo com a distribuição geográfica dessas populações. A análise do fragmento do gene da COI permitiu o desenvolvimento de iniciadores com divergência suficiente entre as espécies em questão para permitir a amplificação de porção específica do gene da COI, que possibilita a diferenciação entre as mesmas. Os iniciadores propostos reúnem características que permitem a sua utilização em reações de PCR multiplex para a diferenciação entre espécimes de ambas as espécies.

Palavras-chave: Moscas-das-frutas; Morfometria; Citocromo oxidase; Caracterização molecular

ABSTRACT

Morphometric and molecular characterization of *Anastrepha bistrigata* Bezzi and *Anastrepha striata* Schiner (Diptera: Tephritidae)

Because of the fact that *Anastrepha striata* Schiner and *Anastrepha bistrigata* Bezzi are very similar morphologically and may also occur sympatrically, this study aimed to propose different ways to characterize them by using wing and aculeus morphometry, and mitochondrial DNA sequencing. This work also aimed to develop species-specific primers to allow for the differentiation between both species in sympatric areas. Six *A. striata* and two *A. bistrigata* populations were obtained from different regions from Brazil, Colombia and Bolivia. Specimens from different populations had their aculeus and wings removed and slide mounted for image acquisition under a stereomicroscope and morphometric analysis. Data collection for morphometry were taken for each specimen on eight segments of the aculeus and on 16 of the right wing. The molecular characterization consisted of the sequencing and analysis of a fragment of the cytochrome oxidase I (COI) gene, and the development of species-specific primers. Morphometry did not indicate any consistent variation to allow for geographical characterization of different populations, but indicated *A. striata* and *A. bistrigata* are consistently different morphologically. Populations of either species from higher altitudes were larger than the ones at lower altitudes, and *A. striata* displayed a much higher intraespecific variation in morphology than *A. bistrigata*. COI nucleotide sequences for *A. striata* were very similar among the populations studied, and the molecular analysis did not yield groups that were related geographically. The COI analysis allowed the development of a set of species-specific primers that were divergent enough to allow for the discrimination of *A. striata* and *A. bistrigata* in multiplex PCR reactions.

Keywords: Fruit flies; Morphometry; Cytochrome oxidase; Molecular taxonomy

1 INTRODUÇÃO

Anastrepha striata Schiner e *Anastrepha bistrigata* Bezzi pertencem ao grupo *serpentina*, que foi caracterizado para incluir 11 espécies, três das quais pertenciam ao grupo *striata* anteriormente (NORRBOM, 2002). As larvas de ambas as espécies desenvolvem-se em goiaba, todavia *A. striata* é mais importante economicamente em vários países da América Latina.

O grupo *serpentina* é mais diversificado no sul da América Central e norte da América do Sul, entretanto, *A. striata* está mais amplamente distribuída no continente americano enquanto *A. bistrigata* ocorre exclusivamente nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil (NORRBOM, 2002; NORRBOM et al., 1999).

A identificação das espécies de *Anastrepha* é baseada nas características do acúleo e no padrão alar. Muitas vezes, dentro de populações ou até mesmo entre espécies muito próximas morfológicamente, os limites específicos são difíceis de serem delimitados, devido principalmente às variações na forma do acúleo, ocasionadas por fatores genéticos e ambientais, o que pode induzir a identificações incorretas. As populações de insetos, inclusive dípteros, frequentemente apresentam variações genotípicas e fenotípicas correlacionadas às regiões geográficas nas quais ocorrem. A seleção natural e a deriva genética são as principais causas dessas variações e ambas são fortemente influenciadas por características ambientais (MAYR, 1942).

Caracteres morfológicos e moleculares adicionais precisam ser explorados para o melhor conhecimento das relações entre espécies pertencentes aos vários grupos de espécies no gênero *Anastrepha* (MacPHERON et al., 1999; NORRBOM et al., 1999). A tendência atual é aliar diversos métodos de identificação para que se tenham identificações acuradas das espécies de *Anastrepha* taxonomicamente semelhantes (ARAÚJO et al., 1998). É importante estudar o grau de diferenciação populacional das espécies, pois isso amplia os conhecimentos sobre as variações geográficas e o *status* taxonômico do grupo em estudo.

Considerando-se a semelhança morfológica entre *A. striata* e *A. bistrigata* e a ocorrência simpátrica delas no Brasil, este estudo tem por objetivo (1) analisar a variação morfométrica, intra e interespecífica, no acúleo e nas asas de populações

simpátricas e alopátricas dessas espécies (2) caracterizá-las molecularmente por meio da análise de seqüências parcial do gene da citocromo oxidase I (COI) e (3) desenvolver iniciadores espécie-específicos que possam vir a ser utilizados em estudos ecológicos em regiões em que ambas as espécies ocorram simpatricamente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Morfometria

A morfometria é a formalização matemática das diferenças entre formas geométricas de objetos. A morfometria geométrica, um dos ramos da morfometria, permite que se comparem os padrões morfológicos a partir de caracteres multivariados, levando-se em consideração simultaneamente várias características em uma estrutura corporal complexa (MONTEIRO; REIS, 1999).

Para se obter dados em morfometria geométrica, são usados marcos anatômicos (*landmarks*), os quais consistem em pontos de referência na estrutura corporal analisada. É fundamental que esses marcos sejam precisamente definidos, distinguíveis e padronizados, consistindo preferencialmente em pontos extremos ou de justaposição de tecidos ou estruturas. As medidas são ordenadas em planilhas de dados. A partir desses dados podem ser feitas diversas abordagens, como a comparação da magnitude das variações, análise estatística das mesmas, entre outras (MONTEIRO; REIS, 1999).

Um dos testes estatísticos utilizados é a análise de variáveis canônicas, a qual fornece uma descrição das diferenças entre os grupos especificados utilizando um conjunto de dados multivariados.

De forma geral, a maioria dos trabalhos sobre variação morfológica em Diptera foi realizada com espécies da família Drosophilidae, principalmente com espécies de *Drosophila*.

Um dos trabalhos iniciais nesse sentido foi realizado por Stalker e Carson (1947), que estudaram a variação morfológica de 45 populações naturais de *D. robusta* Sturtevant, oriundas de 22 localidades dos EUA. Aqueles autores observaram que houve sobreposição das medidas, não só entre as localidades, como também dentro de algumas delas. Os indivíduos de clima frio apresentaram asa longa, cabeça estreita, fêmur longo e tórax pequeno, quando comparados aos indivíduos de clima quente. Stalker e Carson (1949) estudaram também o efeito da variação sazonal na morfologia

de *D. robusta* e observaram marcante relação entre a época de coleta dos espécimens e as medidas obtidas.

Foram verificadas diferenças significativas no comprimento da asa, largura da cabeça e comprimento da tíbia entre as populações de *D. pseudoobscura* Frolova, inclusive entre duas populações coletadas a 10 km de distância uma da outra. Entretanto, nas populações coletadas em diferentes localidades e mantidas em condições uniformes de laboratório a 25°C, não houve correlação estatisticamente significativa entre os parâmetros geoclimáticos avaliados e as medidas obtidas (SOKOLOFF, 1965).

Os trabalhos sobre variação morfológica relacionada com a distribuição geográfica em Tephritidae ainda são relativamente escassos. Para espécies de *Rhagoletis* nos EUA, foram constatadas correlação entre a localização geográfica e o comprimento do acúleo de algumas espécies, mais evidente em *R. pomonella* Walsh. Esse fato foi relacionado ao hospedeiro, uma vez que espécimes coletados em *Pyrus* (Rosaceae) apresentaram variação insignificante, enquanto espécimes obtidos em *Crataegus* (Rosaceae) apresentaram acentuada variação geográfica (BUSH, 1966).

Em estudos de biometria de diversas populações de *D. paulistorum* Dobzhansky & Pavan, coletadas na América Central e do Sul, foram observadas variações morfológicas significativas entre as populações, principalmente entre as originárias de algumas regiões do Brasil e da América Central, indicando que *D. paulistorum* é composta por duas subespécies (PASTEUR, 1970).

Em todas as medidas tomadas de populações de *D. melanogaster* da África e Europa (França), foram obtidas diferenças significativas entre os dois grupos geográficos (DAVID et al., 1977).

Foi observada variação morfológica expressiva no edeago de *D. serido* Vilela & Sene, do Brasil, Argentina e Paraguai, que possibilitou dividir as populações em cinco morfotipos, tendo sido observada correlação entre a morfologia dessa estrutura e o tipo de vegetação existente no local de coleta das populações (SILVA; SENE, 1991).

Em oito populações selvagens de *D. melanogaster* coletadas na Flórida (EUA) e em Manitoba (Canadá), as maiores dimensões médias foram observadas nas populações de locais com latitudes intermediárias, enquanto as de dimensões menores

eram de pontos de coleta nos extremos norte e sul. Portanto, o aumento do tamanho não acompanhou o gradiente de latitude (LONG; SINGH, 1995).

As populações naturais de *D. mediopunctata* Dobzhansky & Pavan, coletadas em diversas altitudes, apresentaram variações morfológicas na forma e na medida da asa, que foram correlacionadas significativamente com a altitude, mas esse fator só explicou pequena parte dessa variação (BITNER-MATHÉ et al., 1995).

Alencar-Sousa (1998) caracterizou populações de *A. fraterculus*, *A. pickeli* e *A. zenildae* através de morfometria multivariada. As espécies generalistas (*A. fraterculus* e *A. zenildae*) apresentam populações morfometricamente semelhantes e a espécie especialista (*A. pickeli*) apresenta diferenciação bastante acentuada no tamanho das estruturas analisadas. Entretanto, o autor comentou que as acentuadas diferenças em *A. pickeli* fossem devidas 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 (HERNÁNDEZ-ORTIZ et al., 2004). Segundo esses autores, existem diferenças estatisticamente significantes entre populações mexicanas e sul-americanas do complexo *A. fraterculus*, em relação à forma do ápice do acúleo e morfologia da asa. O grau de variação morfológica entre populações analisadas do México foi extremamente baixo, o que permite que sejam consideradas, através de análise discriminante, como um morfotipo distinto. Aqueles autores concluíram também que as populações do México e América Central são idênticas e sugeriram que ambas representam uma mesma espécie. Foi também claramente distinguível um segundo grupo (população da Colômbia) e um terceiro (populações do Brasil e uma da Argentina). Esses resultados levaram à conclusão de que os morfotipos mexicano, andino e brasileiro, caracterizados naquele trabalho, podem ser reconhecidos eventualmente como três entidades taxonômicas distintas. Aqueles autores sugeriram também que as amostras de *A. fraterculus* mostraram não só uma grande diferenciação morfológica entre populações, como também representam um complexo, o qual inclui diversos morfotipos.

Araújo e Zucchi (2006) caracterizaram cinco espécies de *Anastrepha* do grupo *fraterculus* através de medidas do acúleo. Concluíram que os tamanhos do acúleo e do

ápice de *A. fraterculus* Wiedemann, *A. obliqua* Macquart, *A. sororcula* Zucchi, *A. zenildae* Zucchi e *A. turpiniae* Stone 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 muito semelhantes, entretanto, essas espécies podem ser separadas por análise discriminante baseada em oito medidas do acúleo (ARAUJO et al., 1998).

2.2 Taxonomia molecular

O avanço das técnicas moleculares nas últimas décadas ofereceram quantidade quase ilimitada de caracteres taxonômicos, o que pode ser de grande ajuda, não só no esclarecimento de questões taxonômicas e evolutivas, como também na revisão de classificações já existentes, sendo que, no caso de *Anastrepha*, análises moleculares baseadas em seqüências do DNA mitocondrial reforçaram a origem monofilética desse grupo de moscas, originalmente proposta após análises morfológicas (NORRBOM et al., 1999; MACPHERON et al., 1999).

A possibilidade da utilização de técnicas moleculares aplicadas à taxonomia e sistemática de insetos foi mais um grande avanço para estudos de genética evolutiva e populacional iniciados na década de 60 com o desenvolvimento de técnicas de eletroforese de proteínas, inicialmente utilizada em estudos de variabilidade genética (HUNTER; MARKET, 1957; LEWONTIN; HUBBY; HARRIS, 1966). No final dos anos 70 e início dos anos 80 foram criadas novas técnicas que permitiram o estudo direto do DNA. Em 1979, estava claro que o DNA mitocondrial (mtDNA) dos animais era a molécula melhor conhecida do genoma de eucariotos (WILSON et al., 1985). Os primeiros trabalhos a estudarem o mtDNA foram conduzidos em 1979 e empregavam a técnica de restrição por polimorfismo de comprimento de fragmentos (RFLP) (AVISE et al., 1979; BROWN; WRIGHT, 1979; BROWN et al., 1979).

Em relação aos tefritídeos, Shigehito et al. (2000) aplicaram essa técnica no estudo do complexo *Bactrocera dorsalis*. Posteriormente ao advento da técnica do

PCR, Han e McPheron (1994), os quais já haviam feito estudos filogenéticos da família Tephritidae utilizando seqüências de DNA nuclear, estudaram as relações entre os taxa dessa família a partir de seqüências do DNA mitocondrial (mtDNA) (HAN; MCPHERON, 1997). Han (2000) utilizou essa mesma seqüência de mtDNA para estudar com mais detalhes a tribo Trypetini, pertencente a essa família. Esses trabalhos elucidaram aspectos da filogenia de tefritídeos que não eram resolvidos apenas por meio de estudos morfológicos e ecológicos, demonstrando claramente a validade dos dados moleculares para aperfeiçoar a classificação dos tefritídeos. As relações evolutivas inferidas nesses estudos, não só são congruentes em grande medida com grupos bem estabelecidos pelas classificações morfológicas, como também sugerem relações que não se conheciam até então. Apesar de tudo, muitos aspectos da história filogenética da família Tephritidae permanecem desconhecidos.

O primeiro estudo a usar seqüências de DNA para analisar as relações entre diferentes grupos de espécies dentro do gênero *Anastrepha* foi o realizado por McPheron et al. (1999), no qual foram analisadas 40 espécies de *Anastrepha* pertencentes a 14 grupos específicos, incluindo 10 espécies do grupo *fraterculus*, usando seqüências de DNA da subunidade maior do ribossomo (16S rDNA). Esse estudo não elucidou satisfatoriamente as relações dentro do grupo *fraterculus* devido à reduzida variação das seqüências do 16S rDNA.

Smith-Caldas et al. (2001) investigaram a relação filogenética e os limites específicos entre espécies de *Anastrepha* pertencentes ao grupo *fraterculus* usando seqüências de DNA da subunidade I do gene mitocondrial da citocromo oxidase (COI), devido ao fato desse gene apresentar regiões variáveis, tornando-o adequado para a análise de grupos taxonômicos mais proximamente relacionados (LUNT et al., 1996; STÅHLS; NYBLOM, 2000), sem contar na disponibilidade de iniciadores universais para a amplificação do gene completo para diversos grupos de insetos (SIMON et al., 1994) e no fato de que esse marcador têm sido útil no estudo da variabilidade genética entre populações e das relações filogenéticas em insetos. A importância e aplicação desse marcador em estudos de taxonomia molecular podem ser verificadas pela sua utilização no código molecular de identificação de espécies (Barcode) (BROWN et al., 1994;

BROWER, 1994; BERNASCONI et al., 2000; MARDULYN; WHITFIELD, 1999; STÄHLS; NYBLOM, 2000; SCARPASSA et al., 2000).

O posicionamento filogenético e as relações sistemáticas das espécies de *Anastrepha* têm sido foco de pesquisas de biólogos evolucionistas há décadas. Diversas espécies aparentemente são parafiléticas, como *A. fraterculus* e *A. obliqua* (SMITH-CALDAS et al., 2001), enquanto a relação com *A. suspensa* (Loew) não tem sido muito investigada e seu atual posicionamento dentro do gênero é baseado numa pequena quantidade de indivíduos (NORRBOM, 2001). Análises do DNA mitocondrial de *A. fraterculus* por PCR-RFLP (STECK; SHEPPARD, 1993) e de proteínas por eletroforese (MORGANTE et al., 1980; STECK, 1991) indicaram alta diversidade intraespecífica, sendo que análises filogenéticas mais recentes de *A. fraterculus* baseadas em seqüências da COI, revelaram ser essa espécie monofilética e, portanto, considerada como um complexo de espécies (SMITH-CALDAS et al., 2001). Consistente para todos os estudos de filogenia de *Anastrepha* é o fato de que o complexo de espécies *A. fraterculus* é mais proximamente relacionado a *A. suspensa* (BARR et al., 2005; McPHERON et al., 1999; SMITH-CALDAS et al., 2001) e não a *A. ludens*, como previamente relatado (WEEMS, 1965; WEEMS et al., 2001).

No entanto, Morgante et al. (1980) observaram discrepâncias entre os dados moleculares obtidos por eletroforese de proteínas e os dados morfológicos usados para inferir relações evolutivas entre *Anastrepha*. Recentemente, a filogenia molecular, usando o gene nuclear *period* sugere que *Anastrepha* é parafilético em relação a *Toxotrypana* (um gênero próximo) (BARR et al., 2005).

Além dos dados de DNA mitocondrial, estudos citológicos indicam que a morfologia cromossômica pode ser útil para propósitos taxonômicos. No entanto, somente o cariótipo de 10% das espécies de *Anastrepha* foi descrito. Selivon et al. (2005) descreveram os cromossomos mitóticos através do bandejamento-C de cinco espécies de *Anastrepha*: *A. amita* Zucchi, *A. turpiniae* Stone, *A. zenildae* Zucchi, *A. grandis* (Macquart) e *A. leptozona* Hendel, e reanalisaram o cariótipo de três outras espécies, *A. distincta* Greene, *A. obliqua* (Macquart) e *A. sororcula* Zucchi. Foi observado, nesse estudo, que as espécies do grupo *fraterculus* apresentam cariótipo similar. Por outro lado, os cromossomos sexuais acrocêntricos nesse grupo exibem

grande variação no comprimento e tamanho e na localização dos blocos de heterocromatina.

Selivon et al. (2007) analisaram a relação entre os cariótipos de *A. striata*, *A. bistrigata* e *A. serpentina*. Os cromossomos mitóticos dessas três espécies foram comparados após coloração seqüencial através de fluorocromos DAPI e cromomicina A3 (CMA), seguidas de bandeamento-C. Os autores propuseram que o cariótipo de *A. bistrigata* pode ter derivado do de *A. striata*, devido à fusão do autossomo III com o cromossomo Y, originando o cromossomo neo-Y. Diferenças maiores podem ser observadas entre os autossomos das outras duas espécies, o que os levou a concluir que *A. striata* e *A. bistrigata* são mais fortemente relacionadas entre si do que com *A. serpentina*.

As diferenciações genéticas e fenotípicas a nível populacional podem ser detectadas através da análise de marcadores morfológicos como forma, coloração, caracteres cariotípicos e morfométricos. Atualmente, marcadores moleculares são muito empregados, como, por exemplo, isozimas, microssatélites de DNA, DNA mitocondrial, espaçadores de DNA ribossômico ITS e NTS (HILLIS; DIXON, 1991; RODERICK, 1996). Marcadores apresentam diversos níveis de resolução, variando conforme o grupo taxonômico. De uma forma geral, a tendência tem sido buscar análises combinadas de marcadores que possuam amplo poder de discriminação e atinjam desde populações em estágios iniciais de divergência até populações onde não há mais fluxo gênico. Entre as ferramentas mais úteis para o estudo de limite entre populações e espécies estão as análises cariotípicas (BONNACORSI et al., 1980), os estudos da variabilidade do DNA mitocondrial e ribossômico (HILLIS; DIXON, 1991) e as análises morfométricas (ADAMS et al., 2004).

Genes e regiões genéticas que têm sido seqüenciados diferem substancialmente entre as atuais pesquisas. Genes como os da COI, 16S, 18S e do fator de alongamento-1a têm sido amplamente utilizados e fornecem informações sobre o grau de divergência de grupos de insetos. A sistemática molecular de insetos complementa e amplia o valor de dados morfológicos e ecológicos, contribuindo com informações fundamentais em relação à biologia evolutiva dos grupos estudados (CATERINO et al., 2000).

As tendências atuais na aplicação da técnica de marcadores de DNA em estudos da ecologia de insetos mostra que o uso de marcadores do DNA mitocondrial (mtDNA), microssatélites, RAPD, EST e AFLP tem contribuído significativamente para o melhor entendimento das bases genéticas da diversidade de insetos e no mapeamento de genes de importância médica e agrária. Os avanços na tecnologia de ferramentas de marcadores moleculares podem ser aplicados em pesquisas entomológicas para uma melhor compreensão da ecologia de insetos ao nível molecular (BEHURA, 2006).

Uma abordagem recente em taxonomia molecular é a adoção do código de barras do DNA ("DNA barcode"). Parte-se da premissa de que uma sequência de DNA curta e padronizada pode ser utilizada na distinção de indivíduos de uma espécie devido à variação genética interespecífica exceder a variação intraespecífica. Várias regiões genéticas têm sido empregadas na sistemática ao nível de espécie. No entanto, defende-se a adoção de um "padrão global" no qual um fragmento de 650 pares de bases na extremidade 5' do gene mitocondrial da COI seja designado como a região barcode para animais (HAJIBABAEI et al., 2007).

O código de barras do DNA pode ser utilizado para a identificação rotineira de espécies, podendo também evidenciar indivíduos atípicos para a compreensão de estudos taxonômicos. Em estudos filogenéticos as sequências do barcode podem ser adicionadas a um banco de dados de sequências para análises filogenéticas. Em estudos de genética populacional essa ferramenta pode fornecer um primeiro sinal de aumento de divergência natural em populações e facilitar estudos comparativos de diversidade populacional em várias espécies. Em grupos pouco estudados taxonomicamente, o código de barras do DNA pode ser levado em consideração antes da taxonomia tradicional, classificando rapidamente espécimes dentro de grupos geneticamente divergentes. Fragmentos mais curtos do gene da COI podem também ser úteis na identificação de espécies com DNA degradado, nas quais a sequência padrão de 650 pb não pode ser obtida (HAJIBABAEI et al., 2007).

A região genética da COI tem se mostrado eficiente em estudos de filogenia de Tephritidae (HAN; McPHERON, 1997). Portanto, essa região foi escolhida nesse estudo pelo fato de conter em sua sequência de bases, regiões variáveis, o que possibilita sua utilização na análise de grupos taxonômicos mais proximamente relacionados (LUNT et

al., 1996; STÅHLS; NYBLOM, 2000). Outros motivos que favoreceram sua escolha foram a disponibilidade de iniciadores (*primers*) conservados para esse gene em diversos grupos de insetos (SIMON et al., 1994) e o fato de que seqüências do gene da COI têm sido empregadas numa série de estudos de relações filogenéticas em insetos (BROWN et al., 1994; BROWER, 1994; BERNASCONI et al., 1999; MARDULYN; WHITFIELD, 1999; STÅHLS; NYBLOM, 2000; SCARPASSA et al., 2000).

2.3 Espécies estudadas

2.3.1 *Anastrepha striata* Schiner

É uma das espécies mais comuns de moscas-das-frutas em toda sua área de distribuição, atacando principalmente Myrtaceae, principalmente goiabas. É praga de importância quarentenária pelo USDA e por outras agências regulatórias (NORRBOM, 2001).

Distribuição geográfica. Ocorre desde o México (Sinaloa, Aguascalientes e Veracruz) América Central, sul do Peru, sul da Bolívia, Brasil e Trinidad (WHITE; ELSON-HARRIS, 1992). Alguns indivíduos foram coletados nos EUA (sul do Texas e Califórnia), mas não é considerada estabelecida nesse país (NORRBOM, 2001). No Brasil, ocorre principalmente nas regiões Norte e Nordeste, havendo também registros no Centro-Oeste e no estado de São Paulo (MALAVASI et al., 2000).

Identificação. Difere facilmente das demais espécies do gênero, exceto de *A. bistrigata*, pelo mesonoto com grande área marrom em forma de “U” freqüentemente interrompida por uma sutura transversa, porém sem outras marcas marrons; mediotergito e subescutelo completamente marrons ou pelo menos lateralmente marrons; pleuritos torácicos e abdome sem áreas marrons; microtríquias do escuto ausentes em uma larga faixa, às vezes interrompida pela sutura transversa na linha dorso-central. *A. striata* também compartilha com *A. bistrigata* os seguintes caracteres: bandas alares marrom-alaranjadas, principalmente a seção central da banda S; célula br com um a área hialina posterior ao pterostigma estendendo-se à largura da célula,

alcançando a nervura R_{4+5} ; extremidade do acúleo larga com pelo menos 0,17 mm e abruptamente triangular; surstilos laterais com um lobo lateral subapical arredondado (NORRBOM, 2001).

A. striata pode ser diferenciada de *A. bistrigata* pelos seguintes caracteres: oviscapo com menos de 2,8 mm de comprimento; acúleo com menos de 2,5 mm de comprimento; escuto com áreas marrons normalmente interrompidas na sutura transversal; sétulas normalmente contrastantes (brancas e marrom escuras), ausentes numa estreita região lateral à área sem microtríquias pós-suturais; seção distal da banda S suavemente estreitada a moderadamente larga no ápice da nervura R_{2+3} , sendo 0,44 a 0,63 vez mais larga na célula r_{2+3} ; ápice do acúleo com 0,24 a 0,31 mm de comprimento; surstilos laterais ligeiramente mais longos e estreitos e aproximadamente paralelos. As microtríquias são normalmente mais densas e com aspecto esbranquiçado (visão anterior oblíqua) quando comparados a *A. bistrigata* além das bandas das asas serem ligeiramente mais claras (NORRBOM, 2001).

Hospedeiros. É uma praga importante na região tropical e subtropical do continente americano, infestando principalmente goiaba e outros frutos de mirtáceas, embora existam registros de ataques em manga, laranja e pêssago (NORRBOM, 2001). Outros hospedeiros registrados são *Psidium sartorarium*, *Spondias* sp, *Persea americana*, *Citrus sinensis*, *Eugenia uniflora*, *Manihot esculenta*, *Syzygium jambos*, *Terminalia catappa* e *Spondias mombin*. (WHITE; ELSON-HARRIS, 1992).

Anastrepha striata tem sido reportada atacando frutos de diversas espécies vegetais nativas e exóticas. Os hospedeiros incluem 42 espécies pertencentes a 24 gêneros e 18 famílias. Desses, 16 gêneros e 26 espécies são hospedeiros nativos, quatro gêneros e 12 espécies pertencem à família Myrtaceae (NORRBOM, 2004). No Brasil estão registrados cinco hospedeiros da família Myrtaceae, um de Anacardiaceae e um de Passifloraceae (ZUCCHI, 2007).

2.3.2 *Anastrepha bistrigata* Bezzi

Distribuição. Ocorre nas regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste do Brasil (Goiás, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo e Santa Catarina) (LIMA, 1934; ZUCCHI,

1978; MALAVASI et al., 2000) O registro de *A. bistrigata* no Peru (KORYTKOWSKI; OJEDA, 1968), baseado em um único macho, sugere que a espécie foi erroneamente identificada (NORRBOM, 2001).

Identificação. A morfologia externa é semelhante à de *A. striata*, mas difere pelas seguintes características: ovíscapo com menos de 3,0 mm de comprimento (2,8mm em *A. striata*); acúleo com mais de 3,0 mm de comprimento (2,5 mm em *A. striata*); sétulas amarelas e marrons, menos densas, porém mais ou menos contínuas lateralmente à área pós-sutural sem microtríquias; seção distal da banda S mais delgada no ápice da R_{2+3} ; ápice do acúleo com 0,35 a 0,40 mm de comprimento 0,24 a 0,31 mm em *A. striata*; surstilos laterais um pouco mais curtos e robustos e ligeiramente divergentes distalmente. As microtríquias do escuto são menos densas e de aparência não tão esbranquiçadas em uma visão oblíqua anterior, quando comparadas às de *A. striata*. As bandas alares normalmente apresentam coloração marrom-claras.

Hospedeiros. Também está fortemente associada às espécies de Myrtaceae (principalmente frutos das espécies de *Psidium*), além de Sapotaceae (espécies de *Pouteria*). Há também registros em manga (Anacardiaceae, *Mangifera indica*) (NORRBOM, 2004). No Brasil, existem registros de infestação em três espécies de Myrtaceae e uma de Sapotaceae (ZUCCHI, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos exemplares

As amostras de *Anastrepha striata* Schiner foram oriundas de três localidades do Brasil – Orizona (Goiás), Caxias (Maranhão) e Oiapoque (Amapá) – uma da Bolívia (Chimoré, Cochabamba) e duas da Colômbia (Toro, Departamento de Valle Del Cauca e Letícia, Departamento do Amazonas). As amostras de *Anastrepha bistrigata* Bezzi foram coletadas em Campinas (São Paulo) e em Orizona (Goiás). Os espécimes foram obtidos de vários coletores e constituem, portanto, amostras ocasionais em armadilhas ou diretamente dos frutos. As amostras estavam devidamente rotuladas e os exemplares fixados em etanol 70%. Os exemplares utilizados para o estudo molecular foram transferidos para etanol absoluto após o recebimento das mesmas, as quais foram então armazenadas a -20°C. Cada exemplar recebeu um código de identificação que distingue a espécie e o local de coleta. A confirmação da identificação das espécies foi baseada no exame ventral do ápice do acúleo. Os *voucher-specimens* estão depositados no Museu de Entomologia Agrícola do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP.

3.2 Análise morfométrica

O acúleo foi extrovertido com auxílio de pinça e estilete, destacado da membrana eversível e colocado em lâmina microscópica. Para limpeza e clarificação, foi colocada uma gota de fenol sobre o acúleo por cerca de 48 horas. Posteriormente o acúleo foi seco em papel filtro e montado em posição ventral entre lâmina e lamínula, contendo meio de Hoyer. Foram examinados acúleos de 10 fêmeas por localidade.

Foram marcados pontos (*landmarks*) na imagem do acúleo (Figura 1) e realizadas as medições dos segmentos entre eles. Cada segmento foi então designado por um código, como se segue:

L1= Largura do acúleo na base do ápice;

L2 = Largura do acúleo no ponto mais estreito da reentrância do ápice;

- L3 = Comprimento do ápice do acúleo a partir da reentrância do ápice;
 L4 = Comprimento do ápice do acúleo;
 L5 = Comprimento da margem do ápice do acúleo;
 L6 = Comprimento da margem do ápice do acúleo, de sua base até a reentrância;
 L7 = Comprimento da margem do ápice do acúleo, da reentrância até o ápice;
 L8 = Comprimento total do acúleo.

Figura 1 - Ápice do acúleo de *Anastrepha striata* ilustrando os segmentos adotados para as medições no mesmo (L1 a L7)

A asa direita foi removida com auxílio de pinça e estilete e montada entre lâmina e lamínula, utilizando-se álcool 70%. Foram medidas as asas de 10 fêmeas de cada localidade.

Foram determinados os pontos (*landmarks*) nas nervuras e foram traçados 16 segmentos, consistindo no perímetro da asa e em transectos perpendiculares e diagonais (Figura 2). Cada segmento foi então designado por um código:

- L1= Distância entre as extremidades distais das nervuras h e R₁
 L2 = Distância entre as extremidades distais das nervuras R₁ e R₂₊₃

- L3 = Distância entre as extremidades distais das nervuras R_{2+3} e R_{4+5}
- L4 = Distância entre as extremidades distais das nervuras R_{4+5} e M
- L5 = Distância entre as extremidades distais das nervuras M e CuA_1
- L6 = Distância entre as extremidades distais das nervuras CuA_1 e A
- L7 = Distância entre a extremidade distal da nervura A e o ponto de bifurcação das nervuras M e CuA_1
- L8 = Distância entre o ponto de bifurcação das nervuras M e CuA_1 e a extremidade distal da nervura h
- L9 = Distância entre as extremidades distais das nervuras R_1 e A
- L10 = Distância entre a extremidade distal da nervura h e a extremidade distal da nervura A
- L11 = Distância entre as extremidades distais das nervuras R_{2+3} e CuA_1
- L12 = Distância entre a extremidade distal da nervura R_1 e o ponto de bifurcação das nervuras M e CuA_1
- L13 = Distância entre as extremidades distais das nervuras R_1 e CuA_1
- L14 = Distância entre as extremidades distais das nervuras R_{2+3} e A
- L15 = Distância entre as extremidades distais das nervuras R_{2+3} e M
- L16 = Distância entre as extremidades distais das nervuras R_{4+5} e CuA_1

Figura 2 - Asa direita de *Anastrepha striata* ilustrando os segmentos adotados para as medições (L1 a L16)

As análises morfométricas do acúleo e da asa foram elaboradas em imagens digitalizadas obtidas pelo sistema de imagens Motic Image Plus 2.0[®], acoplado a um microscópio estereoscópico, usando-se o software Motic Images Advanced 3.2[®]. Foram determinadas as médias e os respectivos intervalos de confiança ($P = 0.05$) para os diferentes segmentos mensurados no acúleo e na asa. Através do Software Statistica 7.1 foi efetuada a análise de agrupamento, onde as unidades taxonômicas operacionais foram os locais e os caracteres foram as medidas (segmentos) tomadas na asa direita e no acúleo.

3.3 Análise molecular

Fêmeas oriundas das populações analisadas, selecionadas para a extração do DNA genômico para a condução dos estudos moleculares, tiveram suas asas e ovipositor mantidos para permitir a confirmação da identificação morfológica do indivíduo (*voucher specimens*), os quais foram preservados em etanol 70% e depositados no Museu de Entomologia Agrícola do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP. Apenas o tórax e a porção basal do abdome dos espécimes selecionados para análise molecular foram utilizados para a extração do DNA genômico. Assim, para cada população, duas fêmeas foram utilizadas, atentando-se ao fato de terem sido coletadas no mesmo local e em períodos amostrais próximos, permitindo, assim, que a variabilidade intrapopulacional também fosse verificada.

3.3.1 Extração do DNA genômico

Os espécimes obtidos para análise foram removidos do conservante original utilizado nos períodos de coleta em questão (etanol 70%) e transferidos para 100% etanol para armazenamento a -20°C até uso. Para a coleta de tecidos para a extração de DNA genômico, os espécimes foram dissecados para a obtenção da porção basal do abdome, a qual foi seca à temperatura ambiente e submetida ao método de sal para a extração do DNA genômico (ALJANABI; MARTINEZ, 1997). Em cada procedimento

de extração foram utilizados o tórax e o abdome de um indivíduo, os quais foram macerados em 400 µl de solução de homogeneização TEN (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mM EDTA pH 8,0; 0,4 M NaCl), acrescida de 40 µl de 20% SDS e 8 µl de proteinase-K (20mg/ml), com auxílio de pistilo estéril. O macerado foi incubado em banho-maria a 55°C (1 h), adicionado de 300 µl de solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), misturado em vortex por 30 segundos e centrifugado a 14,000g por 25 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e transferido para novo recipiente estéril, ao qual foi adicionado 1 volume equivalente de etanol 100% refrigerado. Após agitação em vortex, a amostra foi armazenada a -20°C “overnight”, submetida à centrifugação a 14,000g por 25 minutos (4°C) para precipitação do material genômico, o qual foi lavado em dois banhos sucessivos em etanol 70% refrigerado. O DNA genômico foi sedimentado após centrifugação e mantido à temperatura ambiente para secar (15 min) após remoção de todo o etanol 70%. O material foi então ressuspenso em 20 µl de água MILLI-Q e armazenado a -20°C para uso posterior. A qualidade do DNA genômico extraído foi verificada em gel de agarose 1,0% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, em tampão TAE (1 mM Tris, 83 nM ácido bórico, 1mM EDTA, pH 8.5), e visualizado em transiluminador.

3.3.2 Amplificação da região da Citocromo Oxidase I

As amostras de DNA genômico obtidas dos espécimes extraídos foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação de porção do gene mitocondrial da citocromo oxidase I (COI). Para a amplificação de porção desse gene foram utilizados os iniciadores C1-N-2191 (GGAGGATTTGGAAATTGATT AGTTCC) e C1-J-1718 (CCCGGTAAAATTAATAAATACTTC), os quais amplificam fragmento de cerca de 550 pares de bases, dentro da região proposta para a identificação de espécies através do código de barras do DNA (“DNA barcode”) (Figura 3) (HAJIBABAEI et al., 2007). As reações de amplificação do fragmento da COI para as populações de *Anastrepha striata* e *A. bistrigata* foram conduzidas em volume total de 25 µl, composta por 1µl de gDNA, 5 µl de 5x PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP/cada (10mM/cada), 320 pM de cada iniciador, 0,25 unidade de Taq polimerase

(Fermentas), em termociclador (icycler Thermal Cycler, BioRad) programado a 95°C por 2 min (1 ciclo), seguido por 40 ciclos a 95°C por 30 s, 45°C por 45 s e 72°C por 1 min, com extensão final a 72°C por 10 min.

Os produtos de amplificação foram verificados em gel de agarose a 1,5% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, em tampão TAE, e visualizado em transiluminador.

Figura 3 - Representação do trecho de DNA onde se encontra o gene da COI e localização dos iniciadores utilizados na amplificação do fragmento analisado nesse estudo

3.3.3 Clonagem e seqüenciamento

Os produtos de PCR para o gene da COI dos espécimes das diferentes populações de *A. striata* e *A. bistrigata* analisados nesse estudo foram inseridos em sistema vetor PGENT-Easy (Promega) e clonados em células competentes de *Escherichia coli* 5α (New England BioLab.), seguindo recomendações do fabricante. Os transformantes foram selecionados em placas de LB agar-ampicilina, acrescidas de X-Gal (50µg/ml). Para cada transformante analisado foram selecionados três clones positivos, os quais foram crescidos em LB líquido-ampicilina a 37°C por 16 h e submetidos à extração do DNA plasmidial. O DNA plasmidial foi extraído após crescimento dos clones positivos em meio líquido (16 h a 37°C) e sedimentação das células (12000g x 1 min). O pellet de células foi ressuspensão em 110µl de tampão de ressuspensão (50mM Tris-HCl, pH7.5; 10mM EDTA), acrescido de 10 µl de RNase A (100µg/ml RNase A). Após a ressuspensão das células, adicionou-se 100µl de tampão de lise (400mM NaOH, SDS 2%), e o tubo foi gentilmente agitado por inversão (x3). A

reação de lise foi interrompida com a adição de 120µl de tampão neutralizador (5M acetato e potássio, pH 5,5) e a amostra foi novamente agitada por inversão do tubo, sendo incubada à temperatura ambiente por 3 min e centrifugação a 12.000g (2 min) para sedimentação dos restos celulares. O sobrenadante foi coletado, transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 200 µl de isopropanol gelado e incubação por 1 min à temperatura ambiente. O DNA então foi sedimentado após centrifugação a 14.000g por 1 min, o sobrenadante descartado e o pellet de DNA lavado em banhos sucessivos de 70% etanol, antes de ser seco à temperatura ambiente e ressuspenso em água Milli-Q autoclavada. O DNA plasmidial coletado foi armazenado a -20°C até sua utilização.

Os insertos dos diferentes transformantes foram seqüenciados pela reação do ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing, no Centro de Estudos do Genoma Humano (USP) (http://genoma.ib.usp.br/index_centro.php), utilizando-se dos iniciadores universais T7 e SP6. Todas as seqüências obtidas foram editadas utilizando-se o programa BioEdit Software (disponível eletronicamente em <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

3.3.4 Alinhamento e análise das seqüências

Para se verificar a divergência do DNA mitocondrial entre as diferentes populações de *A. striata*, as seqüências obtidas para o gene da COI dessa espécie foram alinhadas com seqüências disponíveis no banco de dados do National Center for Bioinformatics (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para populações oriundas de outras localidades da América Latina. Assim, além das populações do Brasil, Bolívia e Colômbia analisadas nesse estudo, também foram utilizadas populações do México (números de acesso DQ116224.1 e DQ116225.1), da Guatemala (números de acesso DQ116222.1 e DQ116223.1) e Venezuela (números de acesso DQ116226.1 e DQ116227.1), além de uma outra população do Estado de São Paulo, Brasil (número de acesso DQ116228.1). As seqüências foram alinhadas utilizando-se da ferramenta ClustalW do sistema Mega4.0, com os seguintes parâmetros: penalidade por intervalo aberto ("gap open penalty") = 15 e penalidade pela extensão do intervalo ("gap

extension penalty”) = 6,6 (TAMURA et al., 2007). Após o alinhamento inicial de todas as seqüências “forward” e reversas, as discrepâncias foram corrigidas manualmente e os intervalos das seqüências removidos utilizando-se como referência os traços impressos dos seqüenciamentos.

O método de distância foi utilizado para a reconstrução das árvores filogenéticas para as diferentes populações de *A. striata* estudadas, sendo as distâncias estimadas pelos métodos de Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993), com fator de correção gama igual a 2 para corrigir as taxas desiguais no número e tipo de transições e transversões, e pelo método de parâmetro-2 de Kimura (KIMURA, 1980), ambos disponíveis no pacote estatístico MEGA4.0 (TAMURA et al., 2007). Devido ao fato de que os diferentes algoritmos para construção de árvores filogenéticas assumem pressuposições evolutivas distintas, as seqüências alinhadas foram avaliadas pelos métodos de Neighbour Joining (NJ) e UPGMA. Os dendogramas produzidos pelos métodos NJ e UPGMA de análise foram baseados nas distancias calculadas pelo método de Kimura (KIMURA, 1980), com 1000 repetições para as análises de “bootstrap”. Todas as análises foram conduzidas utilizando-se do pacote estatístico MEGA4.0.

As comparações entre as seqüências de COI obtidas para *A. striata* e *A. bistrigata* para a busca de iniciadores que facilitassem a realização de estudos ecológicos em áreas de ocorrência simpátrica foram realizadas após a produção de seqüência consenso para as populações de *A. striata* analisadas nesse estudo. A seqüência consenso foi produzida após alinhamento dos produtos de amplificação produzidos para as populações de *A. striata* utilizando o programa BioEdit, sendo essa seqüência consenso alinhada àquela obtida para *A. bistrigata* para a localização de regiões específicas que permitissem o desenho de iniciadores espécie-específicos.

Não foi possível realizar a análise de variação intrapopulacional para a espécie *Anastrepha bistrigata*, uma vez que se obteve a seqüência genética da COI de apenas um haplotipo para cada população amostrada (Goiás e São Paulo) dessa espécie. Apenas em parte dos indivíduos selecionados para extração e obtenção da amostra de DNA se obteve sucesso e, das amostras então seqüenciadas, algumas apresentaram resultados insatisfatórios devido à contaminação, na região genética analisada, pelo gene *wsp* do endossimbionte *Wolbachia*. Outro fator que possivelmente influenciou na

não obtenção de seqüências de qualidade foi a degradação do material genético nas amostras disponíveis devido ao longo período de armazenamento em condições sub-ótimas de conservação.

3.3.5 Códigos Adotados

Com a finalidade de facilitar a organização dos dados durante os procedimentos moleculares no processo de alinhamento das seqüências, foram atribuídos códigos nomeando cada amostra. A tabela 1 indica a espécie e localidade correspondente a cada código utilizado.

Tabela 1 - Código atribuído, nos estudos moleculares, para cada população analisada

Código	Espécie	Localização
AS3	<i>A. striata</i>	AMAPÁ
APAS7	<i>A. striata</i>	AMAPÁ
AS29	<i>A. striata</i>	BOLÍVIA
AS72	<i>A. striata</i>	COLÔMBIA - AMAZÔNIA
AS79	<i>A. striata</i>	COLÔMBIA - AMAZÔNIA
AS85	<i>A. striata</i>	COLÔMBIA - VALLE DEL CAUCA
AS89	<i>A. striata</i>	COLÔMBIA - VALLE DEL CAUCA
AS24	<i>A. striata</i>	GOIÁS
AS27	<i>A. striata</i>	GOIÁS
AS34	<i>A. striata</i>	MARANHÃO
AS31	<i>A. striata</i>	MARANHÃO
AB15	<i>A. bistrigata</i>	GOIÁS
AB8	<i>A. bistrigata</i>	SÃO PAULO
ABSP5	<i>A. bistrigata</i>	SÃO PAULO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise morfométrica em *Anastrepha striata* Schiner

4.1.1 Morfometria do acúleo

As medidas no ápice do acúleo, de forma geral, apresentaram pequena variação. A largura do acúleo na base do ápice (L1) e o comprimento total do acúleo (L8) apresentaram maior variação entre as populações. A largura do acúleo no ponto mais estreito da reentrância do ápice (L2) e o comprimento da margem do ápice do acúleo, de sua base até a reentrância (L6) apresentaram menor variação entre as populações analisadas (Figura 4).

O comprimento do acúleo variou de 2,15 a 2,36 mm (Figura 4), ou seja, não ultrapassou 2,5 mm, concordando com a observação de Norrbom (2001). A largura do ápice do acúleo variou de 0,197 a 0,211 (Figura 4). Esses valores também estão de acordo com os dados de Norrbom (2001), que citou que a largura deve ser pelo menos de 0,17 mm.

A partir da análise de agrupamento por similaridade (*cluster*), baseada nas distâncias euclidianas (Figura 5), observa-se maior grau de semelhança entre as populações da Colômbia (Toro e Letícia). A proximidade geográfica entre as duas populações da Colômbia pode explicar essa similaridade morfológica entre elas. Os resultados revelam a formação de um grupo abrangendo as populações do Oiapoque, Caxias, Toro e Letícia (Figura 5). Essas populações encontram-se em latitude e bioma semelhantes e, portanto, esses fatores podem favorecer a menor variação morfológica em relação às dimensões do acúleo. As populações de Orizona (Goiás) e Chimoré (Bolívia) apresentam menor similaridade em relação às demais populações. O comprimento do ápice do acúleo e o comprimento da margem do ápice do acúleo foram distintamente maiores na população de Orizona.

Figura 4 - Variação morfométrica de oito medidas do acúleo de *Anastrepha striata* em seis populações AP-Amapá/Oipaoque, Bol-Bolívia/Chimoré, CO-AM- Colômbia Amazônia/Letícia, CO-VA- Colômbia Valle Del Cauca/Toro, GO-Goiás/Orizona, MA-Maranhão/Caxias

A população de Chimoré possui acúleo e comprimento da margem do ápice do acúleo (da reentrância até o ápice) maiores. De forma geral, as medidas do acúleo dessas duas populações tenderam para ligeiramente maiores que das demais populações, o que pode ter influenciado na formação do grupo na análise de agrupamento por similaridade (Figura 5).

Figura 5 - Gráfico das distâncias euclidianas de oito medidas do acúleo de *Anastrepha striata* em seis populações

Com base nas distâncias de Mahalanobis (Figura 6), os resultados são similares, porém a população de Orizona (Goiás) apresentou menor grau de semelhança com as demais e a de Chimoré (Bolívia) apresentou resultados semelhantes nas duas análises.

Figura 6 - Gráfico das distâncias de Mahalanobis de oito medidas do acúleo de *Anastrepha striata* em seis populações

4.1.2 Morfometria da asa

De forma geral, houve pouca variação nas medidas dos segmentos analisados nas asas de *A. striata* (Figura 7). As medidas com maior variação foram a distância entre as extremidades distais das nervuras M e CuA₁(L5), a distância entre as extremidades distais das nervuras CuA₁ e A (L6), a distância entre as extremidades distais das nervuras R₁ e A (L9), a distância entre as extremidades distais das nervuras R₂₊₃ e CuA₁ (L11) e a distância entre as extremidades distais das nervuras R₄₊₅ e CuA₁ (L16). A distância entre as extremidades distais das nervuras R₂₊₃ e R₄₊₅ (L3), a distância entre as extremidades distais das nervuras R₄₊₅ e M (L4), a distância entre o ponto de bifurcação das nervuras M e CuA₁ e a extremidade distal da nervura h (L8), a distância entre as extremidades distais das nervuras R₁ e CuA₁ (L13), a distância entre

as extremidades distais das nervuras R_{2+3} e A (L14) e a distância entre as extremidades distais das nervuras R_{2+3} e M (L15) apresentaram variação menor (Figura 7).

As populações de Toro (Colômbia) e Orizona (Goiás) ocorrem em altitude maior (cerca de 900 m) e, conseqüentemente, em temperaturas mais amenas, comparadas às existentes em baixas altitudes. Ambas apresentaram as maiores dimensões em quase todas as medidas. Contrariamente, a população do Oiapoque apresentou as menores medidas quando comparada às demais populações (Figura 7).

Diversos estudos têm focado a influência da temperatura no tamanho de certos caracteres morfológicos. *Drosophila melanogaster* e *D. simulans*, criadas em oito diferentes temperaturas, apresentaram tórax e asas maiores (TANTAWY; MALLAH, 1961). O tamanho de várias medidas morfológicas de *D. robusta* teve correlação com a temperatura dos locais onde foram coletadas (STALKER; CARSON, 1947). Em *D. melanogaster*, houve correlação entre o comprimento da asa e a temperatura das regiões de ocorrência das populações (IMASHEVA et al., 1994).

No entanto, outros estudos mostram não haver correlação de temperatura com caracteres os morfológicos. Por exemplo, não houve correlação significativa entre o tamanho da asa de mosca doméstica coletada em um mesmo ponto e a temperatura ambiente em cada período do ano (LOMÔNACO; PRADO, 1994). Também não houve correlação entre e o tamanho de caracteres morfológicos em *D. pseudoobscura* com a temperatura do local de coleta (SOKOLOFF, 1965).

Na análise de agrupamento por similaridade, tanto para distâncias euclidianas como para Mahalanobis, as populações de Oiapoque (Amapá) e de Chimoré (Bolívia) apresentaram menor grau de semelhança com as demais, estando essa última isolada das demais. Os resultados indicam haver uma maior semelhança entre as populações de Orizona (Goiás) e Caxias (Maranhão) e semelhança menor entre as duas populações da região da Colômbia (Figuras 8 e 9).

Não se observou a formação de grupos distintos de populações estudadas. As populações com maior similaridade foram as de Orizona e Caxias. Diferentemente do que foi encontrado na morfometria do acúleo, as populações de Letícia e de Toro (ambas da Colômbia), não formaram um grupo fortemente relacionado (Figuras 8 e 9). A relativa dissimilaridade das medidas das asas entre as populações da Amazônia

Figura 7 - Variação morfométrica de 16 medidas tomadas na asa direita de fêmeas de *Anastrepha striata* em seis populações. AP-Amapá/Oipaoque, Bol-Bolívia/Chimoré, CO-AM- Colômbia Amazônia/Letícia, CO-VA- Colômbia Valle Del Cauca/El Toro, GO-Goiás/Orizona, MA-Maranhão/Caxias

Figura 7 - Variação morfométrica de 16 medidas tomadas na asa direita de fêmeas de *Anastrepha striata* em seis populações. AP-Amapá/Oipaoque, Bol-Bolívia/Chimoré, CO-AM- Colômbia Amazônia/Letícia, CO-VA- Colômbia Valle Del Cauca/El Toro, GO-Goiás/Orizona, MA-Maranhão/Caxias

(Letícia) e do vale situado nos Andes Colombianos (Toro) pode ser explicada por diferenças de temperaturas no hábitat de cada uma, uma vez que as temperaturas da região dos Andes são consideravelmente menores que as da Amazônia.

Diversos outros fatores ambientais influenciem as dimensões dos insetos e é muito provável que esses fatores atuem em conjunto. A variação geográfica não é uma adaptação de uma ou algumas características de um organismo em resposta a um único fator ambiental, mas de processo amplo, abrangendo a adaptação de múltiplos caracteres em resposta aos fatores ambientais, atuando mutuamente (GOULD; JOHNSTON, 1972).

Tem sido observada variação geográfica em muitas espécies de insetos (POWELL, 1979; NEVO, 1988) podendo ocorrer por processos evolutivos locais envolvendo interações entre mecanismos genéticos e processos ambientais. É comum que existam espécies com ampla distribuição, de forma que suas populações habitem diferentes ambientes, podendo cada uma ficar exposta a diferentes padrões de variação ambiental. As populações e espécies respondem tanto genotipicamente como fenotipicamente a essa variedade de condições ambientais, o que ocasiona o desenvolvimento de fenótipos fixados, que apresentam melhor adaptação ao ambiente (BAKER, 1995).

De forma geral, quanto maior a distância entre as populações, mais diferenciadas elas se apresentam em termos de frequência alélica e de características fenotípicas diretamente influenciadas pelo genótipo. Uma consequência à variação geográfica é o desenvolvimento de padrões de variação intraespecífica, que podem causar diferenças em inúmeras características entre duas ou mais populações (KROHNE, 1980).

Entre os caracteres morfológicos, o tamanho é o que apresenta variação geográfica mais facilmente observável, pois varia virtualmente em qualquer espécie que possua distribuição geográfica ampla. As proporções também são muito variáveis na maioria das espécies animais, principalmente o comprimento relativo de extremidades e apêndices (MAYR, 1977). Os métodos morfométricos permitem a detecção desse tipo de variação.

Figura 8 - Gráfico das distâncias euclidianas de 16 medidas da asa direita de fêmeas de *Anastrepha striata* em seis populações analisadas

Figura 9 - Gráfico das distâncias de Mahalanobis de 16 medidas da asa direita de fêmeas de *Anastrepha striata* em seis populações analisadas

4.2 Análise Morfométrica em *Anastrepha bistrigata* Bezzi

4.2.1 Morfometria do Acúleo

As medidas da largura do acúleo na base do ápice (L1), comprimento do ápice do acúleo (L4), comprimento da margem do ápice do acúleo (L5) e comprimento da margem do ápice do acúleo, de sua base até a reentrância (L6) apresentaram variação maior entre as duas populações analisadas. Ao contrário de *A. striata*, em *A. bistrigata* o comprimento total do acúleo (L8) apresentou pouca variação (Figura 10).

Nas duas populações, o comprimento do acúleo mediu mais de 3,0 mm de comprimento, e a largura do ápice do acúleo também foi acima de 0,17 mm (Figura 9), concordando com o relatado por Norrbom (2001). Em todas as medidas, a população de Orizona (Goiás) apresentou dimensões ligeiramente maiores (Figura 10). Essa tendência também pôde ser observada em algumas medidas do acúleo na população de *A. striata* nessa localidade (item 4.1.1).

As condições ambientais podem ser uma das explicações para a diferença no tamanho do acúleo. A população de Orizona foi coletada numa região de serra, vegetação dominante de cerrado e altitude média de mais de 900 m; a de Campinas, em altitude de cerca de 600 m e vegetação de Mata Atlântica. Certamente, diferentes hospedeiros são explorados nesses ambientes, o que pode influir no tamanho do acúleo. Por exemplo, em altitudes menores, há redução significativa nas dimensões de *D. robusta* (STALKER; CARSON, 1948).

4.2.2 Morfometria da asa

Houve pequena variação nas medidas entre as duas populações. Em 14 das 16 medidas, a população de Orizona (Goiás) apresentou dimensões maiores. De forma análoga ao que foi discutido para *A. striata* (item 4.1), as diferenças no clima e na altitude podem afetar diretamente as dimensões das asas (Figura 11). Em amostras de *D. mediopunctata* Dobzhansky; Pavan, coletadas em diferentes altitudes na região do Maciço do Itatiaia (RJ), a forma e as dimensões da asa correlacionaram com a altitude,

no entanto, nem toda variação na forma da asa pôde ser explicada pela diferença de altitude (BITNER-MATHÉ et al., 1995).

Figura 10 - Variação morfométrica de oito medidas no acúleo de *Anastrepha bistrigata* em duas populações . SP- São Paulo/Campinas, GO- Goiás/Orizona

Figura 11 - Variação morfométrica de 16 medidas da asa direita de fêmeas de *Anastrepha bistrigata* em duas populações. SP- São Paulo/Campinas, GO- Goiás/Orizona

Figura 11 - Variação morfométrica de 16 medidas da asa direita de fêmeas de *Anastrepha bistrigata* em duas populações. SP- São Paulo/Campinas, GO- Goiás/Orizona

4.3 Simpatria em Goiás

Apenas de uma localidade (Orizona, Goiás), foram recebidas amostras com exemplares das duas espécies. Tanto na morfometria do acúleo (Figura 12) como na das asas (Figura 13), pôde-se perceber claramente uma distinção nas medidas. *A.bistrigata* apresentou maiores dimensões em praticamente todas as medidas em Orizona. A exceção foi a medida da distância entre as extremidades distais das nervuras R_{4+5} e M (Figura 13).

Apesar de ocorrerem simpatricamente, estudos demonstraram que não há cruzamentos naturais entre essas espécies, o que favorece a existência de certo grau de diferenciação morfológica. Selivon e Morgante (1997) descreveram o comportamento reprodutivo de *A. bistrigata* e seu isolamento de *A. striata*. Observaram que, em condições de cativeiro, ocorriam tentativas de cópula entre as duas espécies, geralmente entre machos de *A. bistrigata* e fêmeas de *A. striata*. Não foram detectados espermatozoides nas espermatecas de fêmeas em cruzamentos interespecíficos, o que sugere a existência de isolamento prezigótico. A atividade diária de acasalamento nas duas espécies mostrou picos de atividades claramente definidos. De acordo com Aluja (1993), o período de acasalamento de *A. striata* em condições de semi-cativeiro ocorre entre 10:00 e 17:00h, com pico das 15:00 às 16:00h. Os dados de Selivon e Morgate (1997), sob condições de laboratório, mostraram praticamente o mesmo padrão, com acasalamentos ocorrendo das 10:00 às 19:00h, concentrando-se das 15:00 às 17:00h.

Anastrepha striata e *A. bistrigata* também apresentam diferenças nos padrões de comportamento reprodutivo (MORGANTE et al., 1993). O comportamento de *A.striata* é mais complexo, com corte constituída por vários eventos. Em *A. bistrigata*, não há corte nem necessidade de reconhecimento preciso de padrões para que o contato seja estabelecido. Portanto, além do isolamento prezigótico, as diferenças nos padrões de comportamento reprodutivo e no período das atividades de acasalamento, explicam o isolamento reprodutivo existente entre essas duas espécies, em regiões onde ocorrem em simpatria.

Figura 12 - Variação morfométrica de oito medidas do acúleo de *Anastrepha striata* e *A. bistrigata* em duas populações simpátricas (Orizona – Goiás)

Figura 13 - Variação morfométrica de 16 medidas da asa direita de fêmeas de *Anastrepha striata* e de *Anastrepha bistrigata* em duas populações simpátricas (Orizona – Goiás)

Figura 13 - Variação morfométrica de 16 medidas da asa direita de fêmeas de *Anastrepha striata* e de *Anastrepha bistrigata* em duas populações simpátricas (Orizona – Goiás)

4.4 Análises moleculares

4.4.1 Diversidade genética de *Anastrepha striata* Schiner

As diferentes populações de *A. striata* apresentaram frequências de uso de nucleotídeos semelhantes na composição de códons do fragmento do gene da citocromo oxidase I analisado nesse estudo (Tabela 2). Timina e adenina foram os nucleotídeos mais abundantes, correspondendo a cerca de 33,7-36,2% e 29,2-30,3% da composição total de nucleotídeos, enquanto citosina e guanina representaram cerca de 18,4-19,2% e 16,6-17,4% dos nucleotídeos analisados, respectivamente (Tabela 2). Os nucleotídeos mais abundantes, timina e adenina, dominaram as posições 1 e 3 dos códons presentes na porção da sequência do gene da COI das diferentes populações de *A. striata* analisadas, enquanto a posição 2 foi preferencialmente ocupada por timina, seguida de proporções equivalentes de adenina e citosina nessa posição (Tabela 2).

A análise de nucleotídeos das populações de *A. striata* em questão também indicou a ocorrência de alta similaridade entre as sequências, indicando a existência média de 483 pares de bases idênticas, em um total médio de 495,7 pares analisados, sendo os pares TT (167 dos 495,7) e AA (144 dos 495,7) os mais comuns. Também foi detectada a existência média de sete pares transicionais e seis transversionais. Em termos médios, foram observadas duas transições na primeira posição do códon, três na segunda e duas na terceira posição nucleotídica do códon, enquanto as transversões ocorreram com frequência média de duas, uma e duas, respectivamente para as posições um, dois e três do códon.

As análises realizadas também indicaram que a divergência genética encontrada no fragmento da COI analisado para as diferentes populações de *A. striata* não permitiu o agrupamento de acordo com a ocorrência geográfica dessas populações (Figura 14). Os cladogramas produzidos após a realização de 1000 repetições para “bootstrap” para os métodos de Neighbour-Joining (NJ) e UPGMA (Figura 14) demonstram a formação de clados contendo indivíduos de origem geográfica distinta, sendo comum o posicionamento de haplotipos de uma mesma região em clados distintos, como a

Tabela 2 - Frequência (%) de uso de nucleotídeos nos codons do fragmento do gene da COI analisado para as diferentes populações de *Anastrepha striata*

	Média geral				Posição 1				Posição 2				Posição 3			
	T(U)	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G
1	33,9	18,4	30,3	17,4	32,9	18,6	29,3	19,2	37,3	21,3	24,3	17,2	31,4	15,4	37,3	16,0
2	34,2	19,1	29,6	17,1	33,1	20,2	28,2	18,4	38,0	21,7	22,9	17,5	31,5	15,5	37,5	15,5
3	34,6	18,9	29,4	17,1	33,7	19,6	28,2	18,4	38,6	21,7	22,3	17,5	31,5	15,5	37,5	15,5
4	34,9	19,0	29,4	16,7	34,1	19,5	28,0	18,3	39,2	21,1	22,9	16,9	31,3	16,3	37,3	15,1
5	34,8	18,7	29,6	16,9	34,1	19,5	28,0	18,3	38,6	21,1	23,5	16,9	31,7	15,6	37,1	15,6
6	33,7	18,6	30,9	16,8	32,7	19,0	30,4	17,9	38,1	20,8	23,8	17,3	30,2	16,0	38,5	15,4
7	34,8	18,7	29,4	17,1	34,8	19,5	27,4	18,3	38,0	21,1	23,5	17,5	31,7	15,6	37,1	15,6
8	34,6	18,8	29,8	16,8	34,1	19,5	28,0	18,3	38,4	21,3	23,8	16,5	31,3	15,7	37,3	15,7
9	34,7	19,0	29,5	16,8	34,1	19,5	28,0	18,3	39,0	21,3	23,2	16,5	31,1	16,2	37,1	15,6
10	34,7	19,0	29,8	16,5	34,1	19,5	28,0	18,3	38,8	21,2	23,6	16,4	31,1	16,2	37,7	15,0
11	34,7	19,0	29,4	16,9	34,1	19,5	28,0	18,3	38,8	21,2	23,0	17,0	31,1	16,2	37,1	15,6
12	34,6	18,9	29,4	17,1	34,1	19,5	28,0	18,3	38,6	21,1	22,9	17,5	31,1	16,2	37,1	15,6
13	34,6	18,9	29,4	17,1	34,1	19,5	28,0	18,3	38,6	21,1	22,9	17,5	31,1	16,2	37,1	15,6
14	34,5	18,8	29,5	17,2	34,4	19,0	28,2	18,4	38,6	21,1	22,9	17,5	30,7	16,3	37,3	15,7
15	34,8	18,8	29,2	17,2	34,5	18,8	27,3	19,4	38,3	21,6	23,4	16,8	31,5	16,1	36,9	15,5
16	34,4	18,9	29,8	16,9	34,1	18,9	28,7	18,3	38,0	22,3	22,9	16,9	31,1	15,6	37,7	15,6
17	33,9	19,2	30,3	16,6	30,6	20,6	30,6	18,2	39,1	20,7	24,3	16,0	32,0	16,3	36,0	15,7
18	36,2	17,1	29,6	17,1	34,8	18,3	28,7	18,3	39,8	18,7	24,1	17,5	34,1	14,4	35,9	15,6

1. AS85COVa, 2. AS31MA, 3. AS34MA, 4. AS27GO, 5. AS79CO, 6. AS3AP, 7. AS89COVa, 8. ASVEDQ116227.1, 9. ASGUDQ116223.1, 10. ASVEDQ116226.1, 11. ASMEDQ116224.1, 12. ASMEDQ116225.1, 13. ASGUDQ116222.1, 14. ASBRSPDQ116228.1, 15. AS29BO, 16. AS72CO, 17. AS7AP e 18. (ver Tabela 1 para identificação das amostras).

colocação do haplotipo AS27 de Goiás em um mesmo clado com o haplotipo AS79 da Colômbia, enquanto os outros haplotipos de Goiás (AS24) e Colômbia (AS72) estão dispostos em posições distantes (Figura 14). Boa parte dos ramos formados apresenta valores de bootstrap inferiores a 50%, indicando o baixo suporte dado para a formação dos mesmos (Figura 14).

No entanto, chama a atenção a formação de um clado bem definido em ambas as análises, formado por seqüências de haplotipos do México, Guatemala e Venezuela, incluindo, ainda, um haplotipo de população brasileira, coletado no Estado de São Paulo (número de acesso no NCBI DQ116228.1), o qual difere dos demais haplotipos coletados e investigados nesse estudo, como aqueles oriundos do Goiás, Amapá e Maranhão (Figura 14). Outro clado que ganha destaque pelo suporte que recebe em ambas as análises é aquele formado por haplotipos do Maranhão, os quais agrupam de forma definida nas duas análises realizadas (Figura 14). As seqüências de indivíduos do Amapá, especialmente do haplotipo AS7, são as mais divergentes dentro do grupo de haplotipos analisados. Os haplotipos da Colômbia e da Bolívia se agrupam de forma distinta nas análises conduzidas, com alguns haplotipos se mostrando muito próximos a haplotipos do Brasil, como os de Goiás e Maranhão (Figura 14).

As distâncias genéticas entre as diferentes populações foram estimadas por dois métodos, cujos resultados apóiam os cladogramas apresentados (Tabela 3). As distâncias estimadas pelos métodos de Tamura-Nei e Kimura foram extremamente próximas, sendo os cladogramas construídos utilizando-se o modelo de Kimura. Os haplotipos AS7 do Amapá e o AS24 de Goiás foram os mais divergentes, apresentando valores de divergência superiores a 5% em relações a todos os demais haplotipos de todas as populações analisadas, incluindo o segundo haplotipo da mesma localização geográfica (Tabela 3). No entanto, a maior divergência observada foi aquela entre esses mesmos haplotipos, AS7 e AS24, com cerca de 9% de divergência estimada em ambas as análises (Tabela 3).

O grau de similaridade da seqüência da COI nas populações amostradas é fortemente relacionado ao fluxo gênico existente nas mesmas. O fluxo gênico, por sua vez, é dependente da taxa de migração entre as populações e a taxa de migração depende do número de populações existentes na região. Além disso, outros fatores que

Figura 14 - Árvores linearizadas de Neighbour-Joining (NJ) (A) e UPGMA (B) para diferentes populações de *A. striata* produzidas a partir da análise de sequência de nucleotídeos de uma porção de 497pb do gene da citocromo oxidase I (COI). Para ambas as análises foram conduzidas 1000 repetições de *bootstrap*, sendo os valores da porcentagem de repetições que confirmam os diferentes ramos colocados junto aos mesmos.

definem o fluxo gênico de uma população são a distribuição geográfica, o padrão espacial, as distâncias entre as populações e a capacidade de dispersão da espécie (FRANKHAN et al., 2002). O fluxo gênico entre grupos de animais em geral, tende a homogeneizar a variação genética entre eles (GENOVART et al., 2003).

Populações podem apresentar-se com diversas estruturas, as quais influenciam o fluxo gênico. Essa estruturação pode se dar na forma de: (1) populações inteiramente isoladas sem nenhum fluxo gênico, (2) vários agrupamentos entre os quais o fluxo gênico é suficiente para que se comportem como uma única e grande população genética, (3) seguindo o modelo de ilhas onde a taxa migração é igual entre ilhas de igual tamanho e distância, (4) de acordo com o modelo de “stepping-stones”, onde há fluxo gênico entre populações vizinhas, (5) baseado no modelo fonte-sumidouro, onde há uma ilha maior que é fonte de migração de indivíduos para ilhas menores e (6) seguindo o modelo de metapopulações, onde há várias populações com freqüentes eventos de extinção e recolonização (BEGON et al., 1996; FRANKHAM et al., 2002).

Quando o ambiente é estável, indivíduos melhor adaptados predominarão, diminuindo a proporção dos menos adaptados. Isso acarreta certa uniformização genética na população, reduzindo, assim, a variabilidade genética. Populações naturais são dinâmicas em muitas dimensões, mudam de tamanho, densidade e localização em função do tempo e espaço. As populações podem fragmentar-se em muitas subpopulações ou fundir-se com outras (HEY; MACHADO, 2003). Populações de diversas espécies são frequentemente subdivididas por fatores geográficos, ecológicos e comportamentais (GENOVART et al., 2003).

Um exemplo de grupo específico geograficamente distinguível é *A. fraterculus*. Smith-Caldas et al. (2001) usando dados da seqüência de DNA do gene da COI, sugeriram que diferentes habitats encontrados, formados a partir de diferentes altitudes e climas, por toda a região na qual a espécie se distribui, podem explicar a formação desses grupos.

Steck (1991) encontrou, na Venezuela, duas populações de *A. fraterculus* muito próximas geograficamente, com grandes diferenças alélicas. Isso pode ser explicado como resultado de seleção natural ou adaptação local de duas populações tendo pouco ou nenhum fluxo gênico entre si, devido a barreiras geográficas como algumas elevações ou ainda diferenças climáticas existentes.

Tabela 3 - Análise da sequência de uma porção de 497pb do gene da citocromo oxidase I de populações de *Anastrepha striata*. Diagonal baixa: distâncias pelo método de Kimura. Diagonal superior: distâncias pelo método de Tajima-Nei

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	*	0,012	0,014	0,019	0,017	0,029	0,023	0,023	0,023	0,025	0,023	0,023	0,023	0,025	0,025	0,025	0,067	0,062
2	0,012	*	0,004	0,012	0,010	0,023	0,017	0,017	0,017	0,019	0,017	0,017	0,017	0,015	0,019	0,019	0,060	0,056
3	0,014	0,004	*	0,008	0,006	0,019	0,012	0,012	0,012	0,015	0,012	0,012	0,012	0,010	0,015	0,014	0,058	0,051
4	0,019	0,012	0,008	*	0,004	0,019	0,012	0,012	0,012	0,015	0,012	0,012	0,012	0,015	0,015	0,015	0,058	0,051
5	0,017	0,010	0,006	0,004	*	0,017	0,010	0,010	0,010	0,012	0,010	0,010	0,010	0,012	0,012	0,012	0,056	0,049
6	0,029	0,023	0,019	0,019	0,017	*	0,023	0,023	0,023	0,025	0,023	0,023	0,023	0,025	0,025	0,025	0,060	0,063
7	0,023	0,017	0,012	0,012	0,010	0,023	*	0,017	0,017	0,019	0,017	0,017	0,017	0,019	0,019	0,015	0,060	0,056
8	0,023	0,017	0,012	0,012	0,010	0,023	0,017	*	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,006	0,019	0,019	0,063	0,051
9	0,023	0,017	0,012	0,012	0,010	0,023	0,017	0,000	*	0,002	0,000	0,000	0,000	0,006	0,019	0,019	0,063	0,051
10	0,025	0,019	0,014	0,014	0,012	0,025	0,019	0,002	0,002	*	0,002	0,002	0,002	0,008	0,021	0,017	0,061	0,054
11	0,023	0,017	0,012	0,012	0,010	0,023	0,017	0,000	0,000	0,002	*	0,000	0,000	0,006	0,019	0,019	0,063	0,051
12	0,023	0,017	0,012	0,012	0,010	0,023	0,017	0,000	0,000	0,002	0,000	*	0,000	0,006	0,019	0,019	0,063	0,051
13	0,023	0,017	0,012	0,012	0,010	0,023	0,017	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	*	0,006	0,019	0,019	0,063	0,051
14	0,025	0,014	0,010	0,015	0,012	0,025	0,019	0,006	0,006	0,008	0,006	0,006	0,006	*	0,017	0,021	0,061	0,049
15	0,025	0,019	0,015	0,015	0,012	0,025	0,019	0,019	0,019	0,021	0,019	0,019	0,019	0,017	*	0,021	0,060	0,051
16	0,025	0,019	0,014	0,014	0,012	0,025	0,014	0,019	0,019	0,017	0,019	0,019	0,019	0,021	0,021	*	0,056	0,058
17	0,066	0,060	0,058	0,058	0,055	0,060	0,060	0,062	0,062	0,060	0,062	0,062	0,062	0,060	0,060	0,056	*	0,090
18	0,062	0,056	0,051	0,051	0,049	0,049	0,056	0,051	0,051	0,053	0,051	0,051	0,051	0,049	0,051	0,058	0,090	*

1. AS85COVa, 2. AS31MA, 3. AS34MA, 4. AS27GO, 5. AS79CO, 6. AS3AP, 7. AS89COVa, 8. ASVEDQ116227.1, 9. ASGUDQ116223.1, 10. ASVEDQ116226.1, 11. ASMEDQ116224.1, 12. ASMEDQ116225.1, 13. ASGUDQ116222.1, 14. ASBRSPDQ116228.1, 15. AS29BO, 16. AS72CO, 17. AS7AP e 18. AS24GO (ver Tabela 1 para identificação das amostras).

No caso de moscas-das-frutas, uma possível explicação para a maior variabilidade observada dentro de algumas populações é a de que subpopulações estejam parcialmente isoladas ou fragmentadas, reduzindo os seus tamanhos efetivos, o que estaria, conseqüentemente, favorecendo a deriva genética.

Uma grande diversidade em disponibilidade de recursos de oviposição pode ser responsável por divergências genéticas intrapopulacionais e, em uma escala temporal e espacial maior, gerar dissimilaridades entre populações de determinada espécie. O surgimento de adaptações que possibilitem a exploração mais eficiente de hospedeiros, ou ainda a exploração de novos hospedeiros acarreta maiores graus de diferenciação genética.

4.5 Desenvolvimento de iniciadores espécie-específicos

A análise comparativa do fragmento do gene da citocromo oxidase I do haplotipo de *A. bistrigata* de São Paulo à seqüência consenso produzida para os demais haplotipos das diferentes populações de *A. striata* do Brasil determinados nesse estudo, permitiu o desenvolvimento de iniciadores com divergência suficiente entre as espécies em questão para permitir a amplificação de porção específica do gene da COI, que leve à diferenciação entre as mesmas (Figura 15). Os iniciadores propostos, AsCOI69 (5'-TAA TAT AAG ATT TTG AYT ATT RCC-3'), para *A. striata*, e AbCOI173 (5'-CTA ACC CTC CAC TCT A-3'), para *A. bistrigata*, apesar da alta variabilidade existente entre os diferentes haplotipos de *A. striata* analisados e à baixa variabilidade na seqüência de nucleotídeos em regiões informativas da porção do gene da COI analisado, entre ambas espécies, reúnem características que permitem a sua utilização em reações de PCR multiplex para a diferenciação entre espécimes de ambas espécies. O iniciador AsCOI69, proposto para *A. striata*, é um iniciador degenerado, com 24 bases, conteúdo de GC de 20,8% e temperatura de deselcoïdização ou de desnaturaço ("melting temperature") (T_m) mdia de $T_m = 44,7^\circ\text{C}$ (T_m mnima = $42,5^\circ\text{C}$; T_m mxima = $46,9^\circ\text{C}$), enquanto o iniciador para *A. bistrigata* mais curto, com apenas 16 bases, contedo de GC de 50% e $T_m = 45,7^\circ\text{C}$.

Esses iniciadores são propostos para utilização em reações de PCR multiplex em conjunto com o iniciador reverso da COI C1-J-1718 (5'-CCC GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC-'3) (T_m = 49,1°C, conteúdo de GC = 26,9%), utilizado na produção do fragmento originalmente avaliado nesse estudo, em reação de amplificação programada a 95°C por 2 min (1 ciclo), seguido por 40 ciclos a 95°C por 30 s, 45°C por 45 s e 72°C por 1 min, com extensão final a 72°C por 10 min, sendo esperado a obtenção de produto de amplificação de produto de reação com 456-464 pb dependendo da região de origem do haplotipo de *A. striata* e de 372 pb para *A. bistrigata*.

O emprego dos iniciadores espécie-específicos possibilitará a confirmação da identificação e diferenciação eficiente das espécies *A. striata* e *A. bistrigata* por meio de reação de PCR multiplex. Outra importância do desenvolvimento desses iniciadores é a possibilidade de uma caracterização genética mais precisa a nível intrapopulacional para as espécies. No entanto, é fundamental que sejam realizados estudos mais amplos em relação à eficiência do emprego desses iniciadores, bem como testes de especificidade dos mesmos em diversas outras populações.

Figura 15 - Alinhamento ClustalW2 entre sequência consenso de porção do gene da COI de haplotipos de populações brasileiras de *Anastrepha striata* e sequência de haplotipo de *Anastrepha bistrigata* da população de São Paulo. As regiões das sequências consenso do gene da COI de *A. striata* e de *A. bistrigata* em destaque marcam as regiões selecionadas como iniciadores específicas para as espécies em questão

5 CONCLUSÕES

A análise morfométrica de *A. striata* e *A. bistrigata* confirma as identificações baseadas na largura e no comprimento do acúleo.

Não há padrões geográficos distintos, pela análise de agrupamento entre as populações de *A. striata* e entre as de *A. bistrigata*.

A. bistrigata apresenta, morfometricamente, similaridade menor entre suas populações em relação a *A. striata*.

As populações de *A. striata* e de *A. bistrigata* de altitudes maiores apresentam dimensões maiores.

As populações de *A. striata* apresentam alto grau de similaridade na sequência genética da COI.

As populações de Toro (Colômbia) e de Orizona (Goiás) apresentam maior variabilidade intrapopulacional.

O seqüenciamento da região da COI pode ser utilizado em complemento à caracterização morfológica para as duas espécies.

As análises realizadas indicaram que a divergência genética encontrada no fragmento da COI analisado para as diferentes populações de *A. striata* não permitiu o agrupamento de acordo com a ocorrência geográfica dessas populações.

Os iniciadores propostos reúnem características que permitem a sua utilização em reações de PCR multiplex para a diferenciação entre espécimes de ambas as espécies.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D.C.; ROHLF, F.J.; SLICE, D.E. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. **Italian Journal of Zoology**, Modena, v. 71, p. 5–16, 2004.
- ALENCAR-SOUZA, J.M.G. **Caracterização de populações e espécies de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no Rio Grande do Norte, através de morfometria multivariada**. 1998. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 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, p. 4692-4693, 1997.
- ALUJA, M. Basic patterns of behavior in wild *Anastrepha striata* (Diptera: Tephritidae) flies under fieldcage conditions. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 86, p. 776-793, 1993.
- ARAUJO, E.L.; ZUCCHI, R.A. Measurement of the aculeus for the characterization of five *Anastrepha* species of the *fraterculus* group (Diptera: Tephritidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 3, p. 329-337, 2006.
- ARAUJO, E.L.; NASCIMENTO, F.M.; ZUCCHI, R.A. Utilização da análise discriminante em estudos taxonômicos de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* Schiner, 1868 (Diptera: Tephritidae). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 1, p. 105-110, 1998.
- AVISE, J.C.; LANSMAN, R.A.; SHADE, R.O. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. I: Population structure of the genus *Peromyscus*. **Genetics**, Austin, v. 92, p. 279-295, 1979.
- AVISE, J.C.; GIBLIN-DAVIDSON, C.; LAERM; PATTON, J.C.; LANSMAN, R.A. Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys oinetis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 76, p. 6694-6698, 1979.
- BAKER, J.S.F.; KREBS, R.A. Genetic variation and plasticity of thorax length and wing length in *Drosophila aldrichi* and *D. buzzati*. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 8, p. 689-709, 1995.
- BARR, N.B.; LIWANG, C.; MCPHERON, B.A. Molecular systematics of nuclear period in genus *Anastrepha* (Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 98, p. 173-180, 2005.
- BEGON, M.; HARPER, J.L.; TOWSEND C.R. **Ecology**: individuals, populations and communities. 3rd ed. Boston: Blackwell, 1996. 1068 p.

- BEHURA, S.K. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. **Molecular Ecology**, Oxford, v.15, n.11, p. 3087–3113, 2006.
- BERNASCONI, M.V.; VALSANGIACOMO, C.; PIFFARETTI, J.C.; WARD, P.I. Phylogenetic relationship among Muscoidea (Diptera: Calyptratae) based on mitochondrial DNA sequences. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 9, p. 67-74, 1999.
- BITNER-MATHÉ, B.C.; PEIXOTO, A.A.; KLACZKO, L.B. Morphological variation in a natural population of *Drosophila mediopunctata*: altitudinal cline, temporal changes and influence of chromosome inversions. **Heredity**, London, v. 75, p. 54-61, 1995.
- BONACCORSI, R.; GHIO, C.; SCROCCO, E.; TOMASI, J. The effect of intramolecular interactions on the transferability properties of localized descriptions of chemical groups. **Israel Journal of Chemistry**, Jerusalem, v.19, p. 109, 1980.
- BROWER, A.V.Z. Phylogeny of *Heliconius* butterflies inferred from mitochondrial DNA sequences (Lepidoptera: Nymphalidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 3, p.159-174, 1994.
- BROWN, W.M.; WRIGHT, J.W. Mitochondrial DNA analysis of the origin and relative age of partenogenic lizards (genus *Cnemidophorus*). **Science**, Washington, v. 203, p. 1247-1249, 1979.
- BROWN, W.M.; GEORGE, M.; WILSON, A.C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 79, n. 4, p.1967-1971, 1979.
- BROWN, W.M.; PELLMYR, O.; THOMPSON, J.N.; HARRISON, R.G. Phylogeny of *Greya* (Lepidoptera: Prodoxidae), based on nucleotide sequence variation in mitochondrial cytochrome oxidase I and II: congruence with morphological data. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 11, p.128-141, 1994.
- BUSH, G.L. The taxonomy, cytology, and evolution of the genus *Rhagoletis* in North America (Diptera, Tephritidae). **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**, Cambridge, v. 134, p. 431-562, 1966.
- CATERINO M.S.; CHO, S.F.; SPERLING, A.H. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 45, p. 1-54, 2000.
- DAVID, J.R.; BOCQUET, C.; DE SCHEEMAEEKER-LOUIS, M. Genetic latitudinal adaptation of *Drosophila melanogaster*: new discriminative biometrical traits between European and equatorial African populations. **Genetics Research**, Cambridge, v. 30, p. 247-255, 1977.
- FRANKHAN, R; BALLOU, J.D.; BRISCODE, D.A. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002. 617 p.

GENOVART, M.L.; ORO, D.; BONHOMME, F. Genetic and morphological differentiation between two largest breeding colonies of Audouin's Gull *Larus audouinii*. **Ibis**, London, v. 145, p. 448-456, 2003.

GOULD, S.J.; JOHNSTON, R.F. Geographic variation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 3, p. 457-499, 1972.

HAJIBABAEI, M.; SINGER, G.A.C.; HEBERT, P.D.N.; HICKEY, D.A. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 23, p. 167-172, 2007.

HAN, H.Y. Molecular phylogenetic study of the tribe Trypetini (Diptera: Tephritidae), using mitochondrial 16S ribosomal DNA sequences. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 28, p. 501-513, 2000.

HAN, H.Y.; MCPHERON, B.A. Phylogenetic study of selected tephritid flies (Insecta: Diptera: Tephritidae) using partial sequences of the nuclear 18S ribosomal DNA. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 22, p. 447-457, 1994.

_____. Molecular phylogenetic study of Tephritidae (Insecta: Diptera) using partial sequences of the mitochondrial 16S ribosomal DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 7, p. 17-32, 1997.

HARRIS, H. Enzyme polymorphisms in man. **Proceedings of the Royal Society of London B. Biological Sciences**, London, v. 164, p. 298-310, 1966.

HERNÁNDEZ-ORTIZ, V.; GÓMEZ-ANAYA, J.A.; SÁNCHEZ, 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, p. 487-499, 2004.

HEY, J.; MACHADO, C.A. The study of structured populations-new hope for a difficult and divided science. **Nature Reviews**, London, v. 4, p. 535-543, 2003.

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

HUNTER, R.L.; MARKET, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. **Science**, Washington, v. 125, p. 1294-1295, 1957.

IMASHEVA, A.G.; BUBLI, O.A.; LAZEBNY, O.E. Variation in wing length in Eurasian natural populations of *Drosophila melanogaster*. **Heredity**, London, v. 72, p. 508-514, 1994.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 16, p. 111-120, 1980.

KORYTKOWSKI, C.; OJEDA PEÑA, D. Especies del genero *Anastrepha* Schiner 1868 en el nor-oeste peruano. **Revista Peruana de Entomologia**, Lima, v. 11 p. 32-70, 1968.

LEWONTIN, R.C.; HUBBY, J.L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, Austin, v. 54, p. 595-609, 1966.

LIMA, A.M.C. Moscas de frutas do genero *Anastrepha* Schiner, 1868 (Diptera: Trypetidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 487-575, 1934.

LOMÔNACO, C.; PRADO, A.P. Morfometria de *Musca domestica* L. de granjas de galinhas poedeiras. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 23, p. 171-178, 1994.

LONG, A.D.; SINGH, R.S. Molecules versus morphology: the detection of selection acting on morphological characters along a cline in *Drosophila melanogaster*. **Heredity**, London, v. 74, p. 569-581, 1995.

LUNT, D.H.; ZHANG, D.X.; SZYMURA, J.M.; HEWITT, G.M. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 5, p. 153-165, 1996.

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

MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A.; SUGAYAMA, R.L. Biogeografia. 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. 93-98.

MARDULYN, P.; WHITFIELD, J.B. Phylogenetic signal in the COI, 16S, and 28S genes for inferring relationships among genera of Microgastrinae (Hymenoptera: Braconidae): evidence of a high diversification rate in this group of parasitoids. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 12, p. 282-294, 1999.

MAYR, E. **Systematics and the origin of species**. New York: Columbia University Press, 1942. 334 p.

_____. **Populações, espécies e evolução.** Trad. de H. Reichardt. São Paulo: EDUSP, 1977. 485 p.

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 systematics and evolutionary relationships of neotropical *Anastrepha*. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 73, p. 622-630, 1980.

MORGANTE, J.S.; SELIVON, D.; SOLFERINI, V.N; MATIOLI, S.R. Evolutionary patterns in specialist and generalist species of *Anastrepha*. In: ALUJA, M.; LIEDO, P. (Ed.). **Fruit flies: biology and management.** New York: Springer-Verlag, 1993. p. 15-20.

NEVO, E. Genetic diversity in nature: patterns and theory. **Evolutionary Biology**, New York, v. 23, p. 217-246, 1998.

NORRBOM, A.L. **Tephritidae classification table.** Disponível em: <<http://www.sel.barc.usda.gov/diptera/tephriti/Tephclas.htm>>. Acesso em: 27 jun. 2001.

_____. A revision of the *Anastrepha serpentina* species group (Diptera: Tephritidae). **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, Washington, v. 104, p. 390-436, 2002.

_____. **Fruit fly (Diptera: Tephritidae) classification: diversity.** Disponível em: <<http://www.sel.barc.usda.gov/diptera/tephriti/Tephclas.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2004.

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

PASTEUR, G.A. Biometrical study on the semispecies of *Drosophila paulistorum* complex. **Evolution**, Palo Alto, v. 24, p. 156-168, 1970.

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

SCARPASSA, V.M.; GEURGAS, S.; AZEREDO-ESPIN, A.M.L.; TADEI, W.P. Genetic divergence in mitochondrial DNA of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) from Brazil and Colombia. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 71-78, 2000.

SELIVON, D.; MORGANTE, J. S. Reproductive isolation between *Anastrepha bistrigata* and *A. striata* (Diptera, Tephritidae). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, p. 583-585, 1997.

SIGEHITO, N.; MAKOTO, M.; KANEDA, M.; SUGIMOTO, T.; MURAJI, M. Identification of *Bactrocera dorsalis* complex species (Diptera: Tephritidae) by PCR-RFLP analysis: A study of variation in mitochondrial DNA D-loop region. **Research of the Plant Protection Service of Japan**, Kyushu, v. 36, p. 37-41, 2000.

SILVA, A.F.G.; SENE, F.M. Morphological geographic variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo v. 35, p. 455-468, 1991.

SIMON, C.F.; FRATI, A.; BECKENBACH, B.; CRESPI, H.; LIU, C.; 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**, College Park, v. 87, p. 651-701, 1994.

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

SOKOLOFF, A. Geographic variation of quantitative characters in populations of *Drosophila pseudoobscura*. **Evolution**, Palo Alto, v. 19, p. 300-310, 1965.

STÄHLS, G.; NYBLOM, K. Phylogenetic analysis of the genus *Cheilosia* (Diptera, Syrphidae) using mitochondrial COI sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 15, p. 235-241, 2000.

STALKER, H.D.; CARSON H.L. Morphological variation in natural populations of *Drosophila robusta* Sturtevant. **Evolution**, Palo Alto, v. 1, p. 237-248, 1947.

_____. An altitudinal transect of *Drosophila robusta* Sturtevant. **Evolution**, Palo Alto, v. 2, p. 295-305, 1948.

_____. Seasonal variation in the morphology of *Drosophila robusta* Sturtevant. **Evolution**, Palo Alto, v. 3, p. 330-343, 1949.

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

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.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 10, p. 512-526, 1993.

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, p.1596-1599, 2007.

TANTAWY, A.O.; MALLAH, G.S. Studies on natural populations of *Drosophila*. 1. Heat resistance and geographic variation of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. **Evolution**, Palo Alto, v. 15, p. 1-14, 1961.

WEEMS, H.V. Jr. ***Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae)**. Gainesville: Florida Department of Agriculture, Division of Plant Industry, 1965. 18 p. (Entomological Circular, 38).

WEEMS, H.V. Jr.; HEPPNER, J.B.; FASULO, T.R.; NATION, J.L. **Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa* (Loew) (Insecta: Diptera: Tephritidae)**. Gainesville: Featured Creatures from the Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, 2001. 347 p.

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

ZUCCHI, R.A. **Taxonomia das espécies de *Anastrepha* Schiner, 1868 (Diptera: Tephritidae) assinaladas no Brasil**. 1978. 105 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1978.

_____. Diversidad, distribución y hospederos del género *Anastrepha* en Brasil. In: HERNÁNDEZ-ORTIZ, V. (Ed.). **Moscas de la fruta en latinoamérica (Diptera: Tephritidae): diversidad, biología y manejo**. Brasília: SyG Editores, 2007. p. 77-100.