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

**Análises morfométrica e molecular de espécies do grupo *spatulata*
(Diptera, Tephritidae, *Anastrepha*)**

Zuzinaide Vidal Bomfim

Tese apresentada para obtenção do
título de Doutor em Ciências. Área
de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2011**

Zuzinaide Vidal Bomfim
Engenheiro Agrônomo

**Análises morfométrica e molecular de espécies do grupo *spatulata*
(Diptera, Tephritidae, *Anastrepha*)**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010

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

Tese apresentada para obtenção do título
de Doutor em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

Piracicaba
2011

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

Bomfim, Zuzinaide Vidal

Análises morfométrica e molecular de espécies do grupo *spatulata* (Diptera, Tephritidae, *Anastrepha*) / Zuzinaide Vidal Bomfim. -- versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010. -- Piracicaba, 2011.
104 p. : il.

Tese (Doutorado) -- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Filogenia 2. Morfometria 3. Moscas-das-frutas 4. Zoologia (Classificação) I. Título

CDD 632.774
B695a

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

Dedico

Ao Senhor dos senhores

Jesus Cristo

Por desprovir da sua natureza divina

Por sua obediência

Por ser o caminho

Por ser a verdade

Por ser a vida

Por se doar sem mácula

Por não nos deixar órfãos

Por ser único mediador entre Deus e os homens

Pelo resgate indescritível da minh'alma

Por seu amor

Ofereço

A minha família

Pelo incentivo, compreensão, companheirismo...

Pela qual oro incansavelmente para que

experimentem qual a boa, agradável e

perfeita vontade de Deus.

AGRADECIMENTOS

Ao excelso Deus por me ajudar a conhecer e a experimentar da graça da vida superabundante por meio de Jesus Cristo, pela sabedoria e coragem suficientes para desenvolver e concluir este trabalho e pela oportunidade de convívio com profissionais como o professor Dr. Roberto Antonio Zucchi, a quem agradeço e congratulo pela brilhante orientação; neste panorama também incluo a professora Dra. Janisete Gomes da Silva-Miller pelas valiosas sugestões e ensinamentos transmitidos, fundamentais para o sucesso desta obra. Não poderia deixar de mencionar ainda a participação do professor Dr. Marco Antonio Costa por todo apoio nas análises moleculares, à Dra. Marinéia de Lara Haddad e ao Dr. Sinval Silveira Neto por proporcionar indispensável suporte nas análises estatísticas. Estendo meus agradecimentos aos professores do Departamento de Entomologia e Acarologia - LEA da USP/ESALQ pelo constante apoio e conhecimento proporcionado por meio das atividades concernentes às obrigatoriedades acadêmicas ao longo do curso. Agradeço à Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/ESALQ) pelo suporte intelectual, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro durante o curso de doutorado e à Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA, pela concessão dos laboratórios de Citogenética e Marcadores Moleculares do setor de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Vale salientar que o êxito desta obra não seria alcançado sem a colaboração de pesquisadores, estudantes e funcionários que enviaram amostras das espécies de moscas-das-frutas de várias regiões do Brasil e de países como Bolívia, México e Paraguai, especificamente: Dr. Miguel Francisco Souza Filho, Instituto Biológico, Campinas, SP, MSc. Gleidyane Novais, MSc. Osmar Arias, MSc. Tiago C. Lima, Dra. Keiko Uramoto e Dra. Clarice Alvarenga USP/ESALQ, Piracicaba, SP, MSc. Mírian S. Santos e MSc. Vívian S. Dutra UESC, Ilhéus, BA, Dra. Beatriz Ronchi Teles, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Brasil, à técnica da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola - EBDA Maria Consuelo, Dr. Elton Lúcio de Araújo e Aline Rocha UFERSA, Mossoró, RN, Dra. Elisabeth Quisberth Ramos, Dr. Vicente Hernández-Ortiz, Instituto de Ecologia, Sistema Nacional de Investigações, Vera Cruz,

México e ao Dr. Ricardo Adaime, Embrapa Amapá, Macapá, AP, agradeço pelas amostras concedidas. Reconhecimento também é merecido às equipes de Divisão de Biblioteca e Documentação e do Serviço de Pós-Graduação pelo eficiente trabalho desenvolvido. Por fim, não menos importante agradeço à MSc. Vinina Ferreira UESC, Ilhéus, BA, Dr. Lincoln S. Rocha e MSc. Paloma Oliveira, Instituto Butantan, São Paulo, SP e MSc. Lorena Andrade UFRB, Cruz das Almas, BA, pelas valiosas informações para a realização das análises morfométricas e; aos companheiros: Anna Frida, Nádia Bertan, Samuel Roggia, Gleidyane Novais, Karina Albernaz, Jhon Saldarriaga, Osmar Arias, Jaci Vieira e Amanda Rodrigues pelo apoio e convivência. À MSc. Kátia M. de Lima UESC, Ilhéus, BA, pelas numerosas ocasiões de apoio e auxílio inestimáveis nas práticas e análises moleculares; aos colegas: MSc. Claudine Gonçalves, MSc. Cíntia Martins, MSc. Olívia Duarte, MSc. Rodolpho Santos, MSc. Antonio Freire, MSc. Aline Medrado, MSc. Emerson Alves e notadamente à Dra. Vanderly Andrade UESC, Ilhéus, BA por fazerem a rotina do laboratório mais agradável, além da ajuda e experiências trocadas. Agradeço especialmente às amigas MSc. Tereza Cristina de Carvalho, Dra. Maria Cristina Canale, MSc. Josina Nimi Kassoma, Dra. Eulália Soler Sobreira Hoogerheide USP/ESALQ, Piracicaba, SP e MSc. Sara Menezes UESC, Ilhéus, BA, pelos momentos de convívio, presteza, alegria e revelações recebidas durante o início de uma nova vida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 DESENVOLVIMENTO	23
2.1 Revisão Bibliográfica	23
2.1.1 Grupo <i>spatulata</i>	23
2.1.2 Morfometria	25
2.1.2.1 Morfometria tradicional	26
2.1.2.2 Morfometria geométrica.....	27
2.1.3 Filogenia molecular	28
2.1.3.1 Estudos filogenéticos em <i>Anastrepha</i>	30
2.2 Material e Métodos.....	31
2.2.1 Obtenção e identificação das espécies	31
2.2.2 Caracterização morfométrica	32
2.2.2.1 Morfometria tradicional	33
2.2.2.2 Morfometria geométrica.....	34
2.2.2.3 Análise de dados morfométricos	36
2.2.3 Caracterização molecular.....	37
2.2.3.1 Extração de DNA.....	37
2.2.3.2 Amplificação de fragmento do gene mitocondrial que codifica para a subunidade I da citocromo oxidase (COI) via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	37
2.2.3.3 Reação de purificação do fragmento amplificado.....	39
2.2.3.4 Sequenciamento	39
2.2.3.5 Alinhamento e análise filogenética das sequencias do fragmento COI	39
2.2.3.6 Análise de máxima parcimônia.....	40
2.2.3.7 Análise de <i>neighbor-joining</i>	40
2.3 Resultados e Discussão	41

2.3.1 Caracterização morfométrica	43
2.3.1.1 Morfometria tradicional.....	43
2.3.1.2 Morfometria geométrica	48
2.3.1.2.1 Análise do tamanho do centróide.....	48
2.3.1.2.2 Análise de deformações relativas	55
2.3.2 Relações filogenéticas de espécies de <i>Anastrepha</i> do grupo <i>spatulata</i> inferidas com base em sequências do gene COI	65
2.3.2.1 Análise de máxima parcimônia	67
2.3.2.2 Análise de <i>neighbor-joining</i>	69
2.3.3 Análise morfométrica e molecular de <i>Anastrepha pickeli</i>	74
2.3.3.1 Morfometria tradicional.....	74
2.3.3.2 Morfometria geométrica	77
2.3.3.2.2 Análise do tamanho do centróide.....	77
2.3.3.2.2 Análise de deformações relativas	77
2.3.3.3 Análise molecular.....	82
2.3.3.3.1 Análise de máxima parcimônia	82
2.3.3.3.2 Análise de <i>neighbor-joining</i>	84
3 CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS	91
ANEXOS	99

RESUMO

Análises morfométrica e molecular de espécies do grupo *spatulata* (Diptera, Tephritidae, *Anastrepha*)

O gênero *Anastrepha* Schiner compreende os dípteros conhecidos popularmente como moscas-das-frutas. O grupo *spatulata* é formado por 11 espécies, entretanto, aquelas que atacam as partes aéreas da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae) têm recebido atenção por causarem prejuízos aos programas de melhoramento dessa cultura. Este trabalho teve por objetivo verificar as variações de populações de *Anastrepha alveata* Stone, 1942, *Anastrepha manihoti* Lima, 1934, *Anastrepha montei* Lima, 1934, *Anastrepha pickeli* Lima, 1934 e *Anastrepha spatulata* Stone, 1942 além de duas espécies não descritas (*Anastrepha* n. sp. 2 e *Anastrepha* n. sp. 3) do grupo *spatulata* de várias localidades do Brasil e também da Bolívia, México e Paraguai. Para tanto, 10 fêmeas de cada população foram submetidas às técnicas de morfometria (tradicional e geométrica), por meio da análise de seis variáveis marcadas no acúleo e de 14 *landmarks* marcados na asa direita, respectivamente. Foi também realizado o sequenciamento de um fragmento do gene citocromo oxidase I (COI) para inferir as relações filogenéticas entre as espécies. Os dados morfométricos foram avaliados pelo *software* Statistica 9.0[®] e as análises moleculares pelos métodos de máxima parcimônia (MP) e *neighbor-joining* (NJ) (MEGA 4.1[®]). O comprimento do ápice do acúleo, a largura do acúleo no final da abertura da cloaca e o comprimento da serra contribuíram de forma significativa para a distinção entre as populações das espécies do grupo. Os testes multivariados mostraram que as variáveis canônicas foram estatisticamente significativas, indicando diferença na conformação alar entre as populações. Os *landmarks* correspondentes às intersecções da nervura R₄₊₅ com a nervura costal, da nervura M com a margem da asa, da nervura CuA₂ com a margem da asa e da nervura Cu₁ com a M foram os que mais contribuíram. A análise filogenética molecular indicou que as populações agruparam-se em clados. Variação interpopulacional foi observada em *A. pickeli* de acordo com os métodos usados neste estudo. Confirmou-se também a separação de duas espécies próximas a *A. pickeli*, que foram previamente reconhecidas como espécies novas (não descritas ainda) com base apenas na morfologia.

Palavras-chave: Moscas-das-frutas; Morfometria tradicional e geométrica; Citocromo oxidase I (COI); Relações filogenéticas; Taxonomia

ABSTRACT

Morphometric and molecular analysis of species in the *spatulata* group (Diptera, Tephritidae, *Anastrepha*)

The genus *Anastrepha* Schiner encompasses the dipterans known as fruit flies. The *spatulata* group comprises 11 species, however, those species that infest the aerial parts of cassava (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae) have received attention as they cause losses to cassava breeding programs. This study aimed at verifying variation in populations of *Anastrepha alveata* Stone, 1942, *Anastrepha manihoti* Lima, 1934, *Anastrepha montei* Lima, 1934, *Anastrepha pickeli* Lima, 1934 e *Anastrepha spatulata* Stone, 1942 and two undescribed species (*Anastrepha* n. sp. 2 and *Anastrepha* n. sp. 3) of the *spatulata* group from various localities in Brazil and also from Bolivia, Mexico and Paraguay. Ten females from each population were studied using morphometric methods (traditional and geometric) and analyzing six variables on the aculeus and 14 landmarks on the right wing, respectively. Sequencing of the cytochrome oxidase (COI) gene was carried out to infer phylogenetic relationships among species. The morphometric data were evaluated by the *software* Statistica 9.0[®] and molecular analysis by the methods of maximum parsimony (MP) and *neighbor-joining* (NJ) (MEGA 4.1[®]). Aculeus tip length, aculeus width at the end of the cloaca opening and the serrate part length contributed significantly to distinguish among populations. The multivariate tests showed that the canonical variables were statistically significant indicating a difference in the wing conformation among populations. Landmarks of the intersections between vein R₄₊₅ and costal, vein M and wing margin, vein CuA₂ and wing margin, and Cu₁ and M contributed the most. Molecular phylogenetic analysis indicated that populations clustered. Interpopulational variation was observed in *Anastrepha pickeli* Lima, 1934 according to the methods used in this study. Also, it was confirmed the separation of two species close to *A. pickeli*, which were previously recognized as new species (not described yet) based on exclusively morphology.

Keywords: Fruit flies; Morphometry traditional and geometric; Cytochrome oxidase I (COI); Phylogenetic relationships; Taxonomy

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Locais das populações de espécies do grupo *spatulata*; Bolívia, México, Paraguai e Brasil - estados do Amazonas (AM), Amapá (AP), Bahia (BA), Espírito Santo (ES), Minas Gerais (MG), São Paulo (SP) e Rio Grande do Norte (RN)32
- Figura 2 - Acúleo de *Anastrepha pickeli* (Montes Claros, MG) contendo os *landmarks* (pontos) e as distâncias analisadas no *software* MotiC Images Advanced 3.2[®]. 1 = Extremidade do ápice do acúleo 2 = final da abertura da cloaca; 3 e 4 = início da serra; 5 = linha indicativa do início da serra; 6 e 7 = linha indicativa do final da abertura da cloaca. As variáveis designadas foram: L1 = 1-2, comprimento do ápice do acúleo (final da abertura da cloaca até a extremidade do ápice do acúleo); L2 = 3-4, largura do acúleo no início da serra; L3 = 2-5, distância entre o final da abertura da cloaca e o início da serra; L4 = 6-7, largura do acúleo no final da abertura da cloaca; L5 = 1-5, comprimento da serra34
- Figura 3 - Asa de *Anastrepha pickeli* (Natal, RN) mostrando os *landmarks* (pontos) do tipo 1, analisados no *software* tpsDig versão 2.12[®]: 1 = intersecção da nervura umeral com a costal; 2 = intersecção da nervura R₁ com a costal; 3 = intersecção da nervura R₂₊₃ com a costal ; 4 = intersecção da nervura R₄₊₅ com a costal; 5 = intersecção da nervura M com a margem da asa; 6 = intersecção da nervura CuA₁ com a margem da asa; 7 = intersecção da nervura CuA₂ com a margem da asa; 8 = intersecção da nervura Cu₁ com M; 9 = intersecção da nervura M com a bm-cu; 10 = intersecção da nervura Cu₁ com a bm-cu ; 11 = intersecção da nervura r-m com a R₄₊₅; 12 = intersecção da nervura r-m com a M; 13 = intersecção da nervura dm-cu com a M; 14 = intersecção da nervura dm-cu com a M; 14 = intersecção da nervura dm-cu com a CuA₁35
- Figura 4 - Esquema de localização dos *primers* utilizados para amplificar os fragmentos de DNA da região citocromo oxidase I (COI) no estudo sobre as relações filogenéticas de espécies de *Anastrepha* do grupo *spatulata*38
- Figura 5 - Esquema de localização dos *primers* utilizados para amplificar os fragmentos de DNA da região citocromo oxidase I (COI) no estudo sobre as diferentes populações de *Anastrepha pickeli*.....38
- Figura 6 - Principais caracteres morfológicos de espécies do grupo *spatulata* utilizados para a confirmação de amostras das espécies obtidas para este estudo. (a) Fêmea de *Anastrepha* (vista lateral); (b) Detalhe do escutelo (vista posterior), subescutelo e mediotergito amarelado

e; (c) Ápices dos acúleos (vista ventral): (1) *A. pickeli*; (2) *Anastrepha* n. sp. 2; (3) *Anastrepha* n. sp. 3; (4) *A. spatulata*; (5) *A. manihoti*; (6) *A. alveata*; (7) *A. alveata* (vista lateral), (8) *A. montei* (em detalhe) e; (9) *A. montei*..... 42

Figura 7- Dendrograma para populações de fêmeas de *Anastrepha manihoti* do Espírito Santo (MAES), Minas Gerais (MAMG) e Bolívia (MABO) gerado a partir das distâncias no acúleo pela análise de agrupamento (UPGMA) 46

Figura 8 - Dendrograma para populações de fêmeas de *Anastrepha* n. sp. 2 de Minas Gerais (MGSB) e *Anastrepha* n. sp. 3. de Minas Gerais e Rio Grande do Norte (MGSC e RNSC) gerado a partir das distâncias no acúleo por análise de agrupamento (UPGMA)..... 47

Figura 9 - Dendrograma para populações de fêmeas de *Anastrepha manihoti*, *Anastrepha pickeli*, *Anastrepha* n. sp. 2 e *Anastrepha* n. sp. 3. de Minas Gerais (MAMG, APMG, MGSB e MGSC), gerado a partir das distâncias no acúleo por análise de agrupamento (UPGMA) 48

Figura 10 - Valores médios e desvio-padrão do tamanho do centróide das asas de fêmeas das populações de *Anastrepha manihoti* do Espírito Santo (MAES), Minas Gerais (MAMG) e Bolívia (MABO) 49

Figura 11 - Dendrograma por distância euclidiana para as populações de *Anastrepha manihoti* do Espírito Santo (MAES), Minas Gerais (MAMG) e Bolívia (MABO) gerado a partir de 14 pontos na asa 50

Figura 12 - Valores médios e desvio-padrão do tamanho do centróide das asas de fêmeas das populações de *Anastrepha montei* do Espírito Santo (MOES), Minas Gerais (MOMG) e São Paulo (MOSP)..... 51

Figura 13 - Dendrograma por distância Euclidiana para as populações de *Anastrepha montei* do Espírito Santo (MOES), Minas Gerais (MOMG) e São Paulo (MOSP) gerado a partir de 14 pontos marcados na asa. 51

Figura 14 - Valores médios e desvio-padrão do tamanho do centróide das asas de fêmeas das populações de *Anastrepha* n. sp. 2 de Minas Gerais (MGSB) e *Anastrepha* n. sp.3 do estado de Minas Gerais (MGSC) e Rio Grande do Norte (RNSC) 52

- Figura 15 - Dendrograma por distância euclidiana para as populações de *Anastrepha* n. sp. 2 de Minas Gerais (MGSB) e *Anastrepha* n. sp.3 do estado de Minas Gerais (MGSC) e Rio Grande do Norte (RNSC) gerado a partir de 14 pontos marcados na asa.....53
- Figura 16 - Valores médios e desvio-padrão do tamanho do centróide das asas de fêmeas das populações das espécies do grupo *spatulata* do estado de Minas Gerais (Brasil): *Anastrepha manihoti* (MAMG), *Anastrepha montei* (MOMG), *Anastrepha* n. sp. 3 (MGSC), *Anastrepha pickeli* (APMG) e *Anastrepha* n. sp. 2 (MGSB)54
- Figura 17 - Dendrograma por distância euclidiana para cinco espécies do grupo *spatulata*, coletadas no estado de Minas Gerais (Brasil): *Anastrepha manihoti* (MAMG), *Anastrepha montei* (MOMG), *Anastrepha* n. sp. 3 (MGSC), *Anastrepha pickeli* (APMG) e *Anastrepha* n. sp. 2 (MGSB) gerado a partir de 14 pontos marcados na asa54
- Figura 18 - Gráfico de dispersão de fêmeas de *Anastrepha manihoti* do estado do Espírito Santo (MAES), Minas Gerais (MAMG) e Bolívia (MABO) no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas após a análise de coordenadas posicionais em plano cartesiano de 14 pontos anatômicos da asa. Os diagramas de deformações ao redor do gráfico indicam as conformações alares presumíveis para indivíduos situados no extremo superior e inferior das variáveis canônicas. As magnitudes das deformações foram aumentadas em 3X para visualização57
- Figura 19 - Gráfico de dispersão de fêmeas de *Anastrepha montei* do estado do Espírito Santo (MOES), Minas Gerais (MOMG) e São Paulo (MOSP) no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas após a análise de coordenadas posicionais em plano cartesiano de 14 pontos anatômicos da asa. Os diagramas de deformações ao redor do gráfico indicam as conformações alares presumíveis para indivíduos situados no extremo superior e inferior das variáveis canônicas. As magnitudes das deformações foram aumentadas em 3X para visualização.....59
- Figura 20 - Gráfico de dispersão de fêmeas de *Anastrepha* n. sp. 3 do estado de Minas Gerais (MGSC), Rio Grande do Norte (RNSC) e *Anastrepha* n. sp. 2 de Minas Gerais (MGSB) no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas após a análise de coordenadas posicionais em plano cartesiano de 14 pontos anatômicos da asa. Os diagramas de deformações ao redor do gráfico indicam as conformações alares presumíveis para indivíduos situados no extremo superior e inferior das variáveis canônicas. As magnitudes das deformações foram aumentadas em 3X para visualização.....61

- Figura 21 - Gráfico de dispersão de fêmeas de cinco espécies do grupo *spatulata* oriundas do estado de Minas Gerais: *Anastrepha manihoti* (MAMG), *Anastrepha montei* (MOMG), *Anastrepha* n. sp. 3 (MGSC), *Anastrepha pickeli* (APMG) e *Anastrepha* n. sp. 2 (MGSB) no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas após a análise de coordenadas posicionais em plano cartesiano de 14 pontos anatômicos da asa. Os diagramas de deformações ao redor do gráfico indicam as conformações alares presumíveis para indivíduos situados no extremo superior e inferior das variáveis canônicas. As magnitudes das deformações foram aumentadas em 3X para visualização 63
- Figura 22 - Relações filogenéticas entre populações de espécies do grupo *spatulata* inferidas de acordo com a árvore de consenso estrito gerada pelo método da máxima parcimônia, com *bootstrap* de 1.000 replicações representados pelos números nos ramos. A figura contém somente os valores de *bootstrap* acima de 50%. Comprimento da árvore: 315 passos, índice de consistência (C.I.) de 0,78 e índice de retenção (R.I.) de 0,80 68
- Figura 23 - Relações filogenéticas entre espécies do grupo *spatulata* inferidas pela árvore de consenso estrito gerada pelo método de *neighbor-joining* com a distância Jukes-Cantor. Os números nos ramos representam os valores de *bootstrap* encontrados a partir de 1.000 replicações. A figura contém somente os valores de *bootstrap* acima de 50%. Comprimento da árvore: 315 passos, índice de consistência (C.I.) de 0,78 e índice de retenção (R.I.) de 0,80 70
- Figura 24 - Dendrograma da análise de agrupamento (UPGMA) das populações de *Anastrepha pickeli* do Amazonas (APAM), Bahia (APBA), Espírito Santo (APES), Rio Grande do Norte (APRN), Bolívia (APBO) e Paraguai (APPA)..... 76
- Figura 25 - Valores médios e desvio-padrão do tamanho do centróide das asas de fêmeas de *Anastrepha pickeli* do Amazonas (APMA), Bahia (APBA), Espírito Santo (APES), Rio Grande do Norte (APRN), Bolívia (APBO) e Paraguai (APPA) 77
- Figura 26 - Gráfico de dispersão de fêmeas de *Anastrepha pickeli* do Amazonas (APMA), Bahia (APBA), Espírito Santo (APES), Rio Grande do Norte (APRN), Bolívia (APBO) e Paraguai (APPA) no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2, geradas após a análise de coordenadas posicionais em plano cartesiano de 14 pontos anatômicos da asa. Os diagramas de deformações ao redor do gráfico indicam as conformações alares presumíveis para indivíduos situados no extremo superior e inferior das variáveis canônicas. As magnitudes das deformações foram aumentadas em 3X para visualização 79

Figura 27 - Relações entre as populações de *Anastrepha pickeli* na árvore de consenso estrito pelo método da máxima parcimônia. Os números nos ramos representam os valores de *bootstrap* encontrados a partir de 1.000 replicações. A figura contém somente os valores de *bootstrap* acima de 50%. Comprimento da árvore: 412 passos, índice de consistência (C.I.) de 0.97 e índice de retenção (R.I) de 0.9683

Figura 28 - Relações entre as populações de *Anastrepha pickeli* na árvore de consenso estrito pelo método de *neighbor-joining* com a distância Jukes-Cantor. Os números nos ramos representam os valores de *bootstrap* encontrados a partir de 1.000 replicações. A figura contém somente os valores de *bootstrap* acima de 50%. Comprimento da árvore: 412 passos, índice de consistência (C.I.) de 0.97 e índice de retenção (R.I) de 0.9685

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de exemplares das espécies de <i>Anastrepha</i> do grupo <i>spatulata</i> (Diptera, Tephritidae) de cada localidade e códigos das populações amostradas.....	44
Tabela 2 - Número de exemplares de cada espécie de <i>Anastrepha</i> e localidades de coleta	66
Tabela 3 - Matriz de distância genética entre as sequências da região COI das espécies de <i>Anastrepha</i>	72
Tabela 4 - Composição nucleotídica média da matriz contendo as sequências da região do gene COI ..	73
Tabela 5 - Composição nucleotídica média da matriz contendo as sequências da região COI, de acordo com a posição do códon	73
Tabela 6 - Dados de coleta e informações sobre as espécies de <i>Anastrepha</i>	75
Tabela 7 - Distâncias de Mahalanobis de populações de <i>Anastrepha pickeli</i> do Amazonas (APMA), Bahia (APBA), Espírito Santo (APES), Rio Grande do Norte (APRN), Bolívia (APBO) e Paraguai (APPA) pelos componentes da forma das asas.....	80
Tabela 8 - Matriz de distância genética entre as sequências da região COI das populações de <i>Anastrepha pickeli</i>	87
Tabela 9 - Composição nucleotídica média da matriz contendo as sequências da região do gene COI das populações de <i>Anastrepha pickeli</i>	88
Tabela 10 - Composição nucleotídica média da matriz contendo as sequências da região COI, de acordo com a posição do códon das populações de <i>Anastrepha pickeli</i>	88

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Anastrepha* Schiner reúne o maior número de espécies de moscas-das-frutas do continente americano, com aproximadamente 230 espécies conhecidas (NORRBOM; KORYTKOWSKI, 2009, 2011). No Brasil, *Anastrepha* é representado por 109 espécies (ZUCCHI, 2008). Além dessa diversidade, várias espécies de *Anastrepha* são pragas importantes da fruticultura, razão do intenso estudo realizado sobre as espécies de *Anastrepha* nas várias áreas do conhecimento.

A taxonomia de *Anastrepha* tem avançado muito nas últimas décadas com a descrição de várias espécies e com os estudos filogenéticos de alguns grupos. Assim, em uma abordagem com base na morfologia, o gênero *Anastrepha* foi dividido em vários grupos entre os quais foi estabelecido o grupo *spatulata* (NORRBOM et al., 1999).

O grupo *spatulata* é formado por 11 espécies, que se caracterizam principalmente pelo ápice do acúleo curto e largo (exceto em *Anastrepha haywardi* Blanchard, 1961 e *Anastrepha montei* Lima, 1934). As espécies do grupo mais estudadas são aquelas cujas larvas atacam a mandioca (*Manihot esculenta*), a saber, *Anastrepha manihoti* Lima, 1934, *Anastrepha montei* Lima, 1934 e *Anastrepha pickeli* Lima, 1934. Essas espécies podem causar perdas de até 30% na produção de frutos, fato que prejudica os projetos de melhoramento da cultura (LOZANO et al., 1983). A distribuição geográfica das espécies do grupo *spatulata* abrange o sul dos EUA (Texas e Flórida), América Central até a Argentina. No Brasil, estão registradas seis espécies *Anastrepha alveata* Stone, 1961, *Anastrepha alveatoides* Blanchard, 1961 e *Anastrepha haywardi* Blanchard, 1961 além das três mencionadas acima (NORRBOM et al., 1999). Entretanto, duas espécies do grupo, coletadas no Brasil, ainda não foram formalmente descritas (CANAL, 1997).

A identificação das espécies de *Anastrepha* é altamente problemática em algumas espécies dentro dos grupos (e.g., grupo *fraterculus*), principalmente para aquelas espécies com ampla distribuição geográfica que podem se constituir em complexo de espécies crípticas. Assim, erros na identificação podem causar sérios problemas para a implementação de programas de manejo integrado, restrições de

quarentena e demais programas de controle (MCPHERON, 2000). Portanto, há uma necessidade contínua de explorar caracteres morfológicos e moleculares adicionais, a fim de elucidar de forma mais precisa a identificação de espécies (MCPHERON et al., 1999; NORRBOM et al., 1999; SMITH-CALDAS et al., 2001).

Este trabalho teve por objetivo caracterizar espécies do grupo *spatulata* de várias localidades do Brasil e também procedentes da Bolívia, México e Paraguai por meio de técnicas morfométricas (tradicional e geométrica) e molecular (sequenciamento de um fragmento do gene COI), visando verificar principalmente o grau de similaridade entre algumas espécies que compõem o grupo. Além disso, essas análises possibilitarão uma melhor definição de duas espécies próximas a *Anastrepha pickeli* Lima, caracterizadas morfolologicamente (CANAL, 1997), mas ainda não formalmente descritas e melhor conhecimento de cinco espécies do grupo (*A. alveata*, *A. manihoti*, *A. montei*, *A. pickeli* e *Anastrepha spatulata* Stone, 1942).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Grupo *spatulata*

O grupo *spatulata* foi originalmente caracterizado por Shaw (1962) tendo como característica principal a presença de um ponto negro na parte mediana da sutura escudo-escutelar, além do ápice do acúleo curto e achatado (em forma de espátula) com numerosos denticulos. Incluiu primeiramente *Anastrepha spatulata* Stone, 1942; *Anastrepha infuscata* Shaw, 1962 e *Anastrepha triangulata* Shaw, 1962. As duas últimas são sinônimas de *A. spatulata* (HERNÁNDEZ-ORTIZ, 1990). Posteriormente, na classificação infragenérica, proposta por Norrbom e Kim (1988), foram incluídas *Anastrepha alveata* Stone, 1942; *Anastrepha alveatoides* Blanchard, 1961; *Anastrepha distans* Hendel, 1914; *Anastrepha manihoti* Lima, 1934; *Anastrepha montei* Lima, 1934; *Anastrepha pickeli* Lima, 1934 e *Anastrepha umbrosa* Blanchard, 1961. Após uma análise envolvendo caracteres morfológicos, Norrbom et al., (1999) adicionaram *Anastrepha haywardi* Blanchard, 1961 e *Anastrepha interrupta* Stone, 1942.

Atualmente, o grupo é composto por 11 espécies com a adição de *Anastrepha enkerlini* Hernández-Ortiz, 1998. As espécies desse grupo ocorrem desde áreas restritas do sul dos EUA (Texas e Flórida), passando por países da América Latina até a Argentina (NORRBOM et al., 1999).

A presença de acúleo curto e com ápice largo (exceto em *A. montei* e *A. haywardi* em que o ápice é extremamente fino) com numerosos dentes finos além da base (menor em *A. haywardi*), pode ser uma sinapomorfia do grupo. Uma apomorfia é caracterizada por um longo apêndice respiratório nos ovos de *A. manihoti* e *A. pickeli*, exceto nos ovos de *A. alveatoides* (NORRBOM et al., 1999).

Até o momento, as espécies do grupo estão associadas aos hospedeiros de Euphorbiaceae, Bombacaceae e Olacaceae (NORRBOM et al., 1999; ZUCCHI, 2000a). Não são consideradas espécies-praga, porém mostram-se como potenciais, pois causam prejuízos aos projetos de melhoramento, principalmente, da cultura da mandioca, *Manihot esculenta* Crantz (LORENZO et al., 1983; GRANER, 1942).

Das espécies pertencentes ao grupo, três são encontradas com maior frequência, as quais também estão assinaladas no Brasil - *A. pickeli*; *A. montei* e *A. manihoti* - cujos hospedeiros são representados por espécies de *Manihot* (Euphorbiaceae) e *Quararibea turbinata* (Malvaceae) (NORRBOM et al., 1999; ZUCCHI, 2008). Essas espécies são consideradas especialistas na exploração de recursos alimentares, pois as plantas do gênero *Manihot* apresentam um glicosídeo cianogênico que em contato com a enzima linamarase, após danificação dos tecidos, é altamente tóxico para a cadeia respiratória (JESUS et al., 1986). Esse fato indica que essas espécies apresentam um mecanismo eficiente de detoxicação dos glicosídeos presentes nos frutos, além disso, as diferenças na espessura dos acúleos embasaram a sugestão de uma diversificação dentro do grupo a partir desse evento de colonização do hospedeiro (MORGANTE et al., 1996).

Além dessas espécies, o grupo é representado no Brasil também por *A. alveata*, *A. alveatoides* e *A. haywardi*, que foram coletadas em armadilhas em pomares da Bahia e do Mato Grosso do Sul (NASCIMENTO et al., 1993; UCHÔA et al., 1998). As demais espécies do grupo - *A. spatulata*, *A. interrupta*, *A. distans* e *A. umbrosa* - ocorrem em áreas restritas do sul dos EUA (Texas) à Argentina (FOOTE et al., 1993; NORRBOM et al., 1999) e *A. enkerlini* está registrada apenas no México (HERNANDÉZ-ORTIZ, 1998).

Duas espécies próximas a *A. pickeli*, coletadas em armadilhas instaladas na região de Nova Porteirinha, no estado de Minas Gerais, foram referidas como *Anastrepha* n. sp. 2 e *Anastrepha* n. sp. 3 (CANAL, 1997). Recentemente, ARAÚJO et al. (2005) registraram *Manihot glaziovii* Mull Arg. (maniçoba) como planta hospedeira de *Anastrepha* sp. aff. *pickeli*, sem associá-la a uma das espécies descobertas por CANAL (1997), coletada na região semi-árida do estado do Rio Grande do Norte.

Alguns autores cogitam a possibilidade de inclusão de *Anastrepha nascimentoi* Zucchi, 1979 (registrada no estado da Bahia e Espírito Santo) (MARTINS et al., 2005; NASCIMENTO et al., 1981) no grupo *spatulata*. Essa espécie apresenta acúleo curto com ápice largo e serrado e tem como hospedeiro, frutos de *Cathedra bahiensis* Sleumer, Olacaceae) (URAMOTO et al., 2008), que é hospedeiro também de outras espécies do grupo *spatulata*, e. g., *A. alveata* e *A. interrupta* (NORRBOM et al., 1999).

Outros pesquisadores também mencionaram a possibilidade de inclusão de *Anastrepha rheediae* Stone, 1942 e *Anastrepha tecta* Zucchi, 1979 no grupo *spatulata* (NORRBOM et al., 1999). Atualmente, *A. nascimentoi*, *A. rheediae* e *A. tecta* não estão incluídas em nenhum grupo de espécies. A associação mosca-hospedeiro reforça a hipótese de que há correlação entre os hospedeiros e as relações filogenéticas das espécies de *Anastrepha* (URAMOTO et al., 2008).

2.1.2 Morfometria

A morfometria é um método que utiliza estatística para a análise de mudanças morfológicas, bem como, variações biológicas da forma (BOOKSTEIN, 1991; MONTEIRO et al., 2000; MONTEIRO et al., 2003).

O desenvolvimento da morfometria, tanto na elaboração quanto na melhoria de métodos estatísticos foram impulsionados pelo trabalho de D'arcy Wentworth Thompson, intitulado "On Growth and Form" (REYMENT et al., 1984). Contou com a contribuição de outros pesquisadores como Francis Galton, Karl Pearson, Sewall Wright, Charles Spearman e Ronald Fisher para que se tornasse a base de toda a análise multivariada desenvolvida ao longo do século XX (MONTEIRO; REIS, 1999).

Na análise multivariada, muitas medidas, cada uma variando individualmente em um grupo, são consideradas como um simples conjunto de variáveis que descreve a forma de uma amostra de indivíduos, tornando possível contrastar padrões de variação, que são definidos pelas relações totais entre as medidas (PIMENTEL, 1979).

As análises discriminantes de componentes principais e de variáveis canônicas são as análises multivariadas de maior aplicação na morfometria (BLACKITH; REYMENT, 1971; JAMES; MCCULLOCH, 1990; REIS, 1988). Essas técnicas têm por objetivo, reduzir a dimensionalidade de dados, que diferem em sua estruturação em termos de existência de grupos, e explicar a variação morfológica em função de um menor número de variáveis a partir dos autovetores, fato que permite a interpretação da variação morfológica quanto à ordenação de populações (MONTEIRO; REIS, 1999).

A análise de variáveis canônicas permite verificar a variação entre grupos, pois apresenta a magnitude das diferenças entre grupos e dentro de cada grupo pelo fato de especificar os grupos anteriormente à análise e não considerar as correlações entre

as variáveis (CAVALCANTE; LOPES, 1993). É de grande utilidade na sistemática por indicar caracteres que mais contribuem para a discriminação dos grupos de organismos ao longo de cada variável canônica (BLACKITH; REYMENT, 1971).

Apesar da análise de componentes principais ser uma combinação linear dos caracteres morfométricos e uma técnica de ordenação exploratória, revela um padrão total de variação (não distingue variações dentro dos grupos (THORPE, 1976)), e somente os dois ou três primeiros caracteres são interpretados com maior sentido biológico, pois explicam a maior porcentagem de variação nos dados (REYMENT; BLACKITH; CAMPBELL, 1981).

As variações no tamanho e na forma de determinada estrutura biológica são analisadas, principalmente, por meio das técnicas de morfometria tradicional e geométrica. Esses métodos são utilizados em diferentes estudos visando esclarecer e detectar variações intra e interespecíficas, principalmente em insetos (AÑES et. al., 1997; HENSLEIGH; ATCHLEY, 1997; HRIBAR, 1994; IMASHEVA et. al., 1995; MCNAMEE; DITHAM, 1993; MENDONÇA; REIS, 1991), além de ter sido aplicada em outras áreas como a antropologia, citologia e geologia (DALY, 1985; JAMES; MCCULLOCH, 1990).

2.1.2.1 Morfometria tradicional

A morfometria tradicional está calcada na medida de distâncias lineares entre pontos extremos de estruturas (MONTEIRO; REIS, 1999; ADAMS et al., 2004) e teve utilidade juntamente com a estatística no século XIX (ASTÚA, 2003).

O emprego dessa metodologia com moscas-das-frutas no Brasil foi iniciado por Selivon (1996). Posteriormente, foi feito um estudo envolvendo a caracterização genética e morfológica de duas espécies crípticas do complexo *fraterculus* por meio da morfometria tradicional em conjunto com técnicas moleculares, onde se verificou que *Anastrepha* sp. 1 aff. *fraterculus* e *Anastrepha* sp. 2 aff. *fraterculus* constituem entidades biológicas distintas (SELIVON et al., 2005). Alencar-Sousa (1998) também caracterizou populações de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830), *A. pickeli* e *Anastrepha zenildae* Zucchi, 1979 por meio da morfometria. As espécies generalistas (*A. fraterculus* e *A. zenildae*) apresentaram populações morfometricamente

semelhantes e a espécie especialista (*A. pickeli*) apresentou diferenciação bastante acentuada no tamanho das estruturas analisadas.

A análise morfométrica das medidas do comprimento e do ápice do acúleo foi usada na caracterização de cinco espécies do grupo *fraterculus* no Brasil (ARAÚJO et al., 2006) e para distinguir populações de *A. fraterculus* da Argentina, Brasil, Colômbia e México (HERNANDEZ-ORTIZ et al., 2004).

2.1.2.2 Morfometria geométrica

A morfometria tradicional não permite capturar a geometria das estruturas biológicas estudadas. Assim, surgiu a morfometria geométrica, na qual não se usam as distâncias e medidas, mas os marcos anatômicos (*landmarks*) (BOOKSTEIN, 1991).

A morfometria geométrica consiste em um método de estudo da geometria de formas a partir das coordenadas de marcos anatômicos, obtidas quando os pontos são localizados em um sistema de eixos cartesianos. Após aplicação de vários procedimentos, que tornam os indivíduos comparáveis quando à variação na forma, podem-se visualizar as diferenças da forma entre estruturas biológicas por meio das deformações plotadas em grades cartesianas (RHOLF; MARCUS, 1993; MONTEIRO; REIS, 1999; ADAMS et al., 2004).

Há três tipos de pontos que são frequentemente interpretados como marcos anatômicos, porém o tipo 1 denominado justaposição discreta de tecidos é considerado mais consistente por incluir pontos onde há interseção das estruturas, ou seja, são fáceis de serem definidos.

Comumente em insetos, as asas têm sido as principais estruturas de estudos de morfometria geométrica, em razão da forma predominantemente bidimensional e grande número de caracteres (pontos determinados pela intersecção das nervuras).

Poucos trabalhos foram feitos com a aplicação da morfometria geométrica em *Anastrepha*. Os primeiros estudos envolveram a utilização de outros marcadores, para caracterizar populações de *Anastrepha sororcula* Zucchi, 1979 a partir de caracteres das asas (ROCHA, 2005). Além disso, foi feito um estudo com duas espécies do complexo *fraterculus* (NASCIMENTO, 2000) e com espécies pertencentes a seis grupos de *Anastrepha* com o intuito não só de caracterizar morfometricamente as

espécies, mas também de procurar possíveis padrões morfológicos associados ao dimorfismo sexual (NASCIMENTO, 2005).

2.1.3 Filogenia molecular

A biologia molecular surgiu a partir do desenvolvimento de técnicas bioquímicas que permitem examinar a estrutura molecular de proteínas e ácidos nucleicos (AVISE, 1994; LI, 1997). Tem sido útil no esclarecimento de estudos sistemáticos considerados problemáticos pelos morfologistas.

Os métodos mais antigos e dispendiosos como a eletroforese de proteínas, hibridização de DNA e métodos imunológicos foram substituídos por técnicas como PCR (*Polymerase Chain Reaction*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), microssatélites, bem como o sequenciamento de proteínas e ácidos nucleicos para a análise do DNA mitocondrial e/ou nuclear. Essas técnicas tornaram-se amplamente utilizadas em estudos de relações filogenéticas entre populações ou espécies, por gerar informações sobre variabilidade genética (SOLE-CAVA, 2004; PRIMROSE, 2003).

Atualmente, o emprego dessas técnicas, em estudos genéticos de diversos organismos, inclusive nos tefritídeos, têm variado conforme a dificuldade técnica, nível de variabilidade genética que pode ser detectado, custos e tempo envolvidos (SILVA, 2000).

Muitos pesquisadores têm aplicado novas técnicas com maior nível de resolução, não só em estudos taxonômicos, mas nas diversas áreas da biologia por meio do uso de marcadores moleculares. Isto ocorre devido ao grande número de genes de funções bioquímicas diversas que podem ser sequenciados e analisados para investigações que envolvem estudos de relações filogenéticas (HILLIS; DIXON, 1991; LOXDALE; LUSHAI, 1998).

Os sistemas de marcadores de DNA apresentam um maior nível de polimorfismo, além das mutações nos íntrons e códons fornecerem maior nível de variação, quando comparados a marcadores de proteínas (BEHURA, 2006).

Pesquisas envolvendo vários estudos genéticos empregando técnicas moleculares têm possibilitado uma melhor caracterização da variabilidade genética de

espécies de Tephritidae. Estas pesquisas têm revelado ou confirmado a presença de vários complexos de espécies crípticas e respondido questões relativas à genética de populações e sistemática de alguns grupos de *Anastrepha* (SILVA, 2000).

Os dados moleculares têm sido uma poderosa ferramenta de estudo da história evolutiva, de forma a possibilitar a reconstrução da filogenia dos maiores grupos de organismos vivos.

As relações filogenéticas no gênero *Anastrepha* foram investigadas pela primeira vez através de técnicas moleculares, mais especificamente eletroforese de isozimas, por Morgante et al. (1980). Nesse estudo, foram analisados 11 locos para 13 espécies de *Anastrepha* que ocorrem no Brasil, além de *Anastrepha ludens* Loew, 1873 e *Anastrepha suspensa* Loew, 1862 (do México e Flórida, respectivamente).

Posteriormente, Steck (1991) realizou estudo isozímico para diferentes populações de *A. fraterculus*, *Anastrepha obliqua* Macquart, 1835, *Anastrepha distincta* Greene, 1934 e *Anastrepha striata* Schiner, 1868 de várias localidades, e obteve resultado semelhante ao proposto por Norrbom; Kim (1988).

Entre os métodos de análise das reconstruções filogenéticas a partir de dados moleculares, os mais utilizados são os de máxima parcimônia e *neighbor-joining*.

O método de máxima parcimônia supõe que a maior probabilidade de recuperação da árvore, que melhor representa a filogenia do grupo, está no menor número de mudanças que explique toda a variação observada nas sequências alinhadas. No método do vizinho mais próximo (*neighbor-joining*), conectam-se os dois táxons mais estritamente relacionados que possam ser considerados um único táxon e o processo se repete até que todos estejam conectados (SCHNEIDER, 2007).

2.1.3.1 Estudos filogenéticos em *Anastrepha*

Muitos estudos moleculares com tefritídeos têm sido publicados nos últimos anos, mas apenas quatro estudos abordaram a filogenia de *Anastrepha* utilizando sequências de DNA: análise de espécies de *Anastrepha* usando o gene 16S do DNA mitocondrial (MCPHERON et al., 1999), análise do grupo *fraterculus* usando a subunidade I do gene citocromo oxidase, COI, (SMITH-CALDAS et al., 2001), análise de espécies de *Anastrepha* usando o gene nuclear *period* (BARR et al., 2005) e análise de populações de *A. suspensa* utilizando também o gene COI (BOYKIN et al., 2006; SILVA & BARR, 2006).

Análises filogenéticas usando o gene mitochondrial 16S (MCPHERON et al., 1999) e o gene nuclear *period* (BARR et al., 2005) claramente indicaram que *Anastrepha* não constitui um grupo monofilético (SILVA & BARR, 2006).

Como mencionado anteriormente, Norrbom et al. (1999) identificaram 17 grupos de espécies de *Anastrepha*. Vários desses grupos são considerados artificiais pelos autores. Embora as análises com os genes 16S (MCPHERON et al., 1999) e *period* (BARR et al., 2005) tenham incluído espécies representando 15 grupos, seis deles foram representados por uma única espécie, não permitindo assim a avaliação da monofilia. Cabe destacar que o grupo *spatulata*, monofilético com base na morfologia, não se apresentou monofilético nas análises moleculares. Por exemplo, *Anastrepha spatulata* Stone não forma clado com as outras espécies do grupo *spatulata*, embora apenas cinco espécies do referido grupo tenham sido estudadas.

Norrbom et al., (1999) consideraram o grupo *spatulata* como monofilético, porém afirmaram que as espécies desse grupo apresentam respostas filogenéticas diferenciadas quando submetidas a diferentes métodos de análises morfológica e molecular. Por exemplo, McPheron et al., (1999) verificaram que no método *neighbor-joining* (NJ) *A. montei*, *A. pickeli* e *A. alveata* agruparam-se em um mesmo clado, porém *A. spatulata* ficou mais próxima do grupo *fraterculus* e quando submetida à análise da máxima parcimônia (MP), uniu-se ao grupo *pseudoparalella* e, em outro caso, permaneceu no grupo *spatulata*.

Solferini e Morgante (1987) e Morgante et al. (1996), analisando o cariótipo de *A. pickeli* e *A. montei*, constataram que o número diplóide de cromossomos (8) é inferior

ao das demais espécies (12) de tefritídeos. Embora o número de cromossomos seja reduzido, o comprimento total do cariótipo é o mesmo. Aqueles autores sugeriram que esse caráter poderia estar particularmente associado a um único evento de colonização do hospedeiro (espécies de *Manihot*).

A subunidade I do gene mitocondrial da citocromo oxidase, (COI), tem sido usada em estudos que envolvem grupos de táxons mais estritamente relacionados, e. g., grupo *fraterculus* (Smith-Caldas et al., 2001), por apresentar regiões variáveis, além da disponibilidade de *primers* e ser usado em uma série de análises filogenéticas em insetos.

Poucos estudos morfométricos e genéticos envolveram as espécies do grupo *spatulata*. Para algumas, não existem quaisquer estudos sobre variabilidade populacional. Portanto, este é um trabalho pioneiro que poderá fornecer subsídios para investigações futuras, entre elas, evolução do uso de hospedeiros, colonização, relações filogenéticas e programas de controle.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Obtenção e identificação das espécies

As amostras foram recebidas de pesquisadores de vários estados brasileiros e de três países da América Latina (Bolívia, México e Paraguai). Do Brasil, foi possível obter exemplares de seis estados (Amapá, Amazonas, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio Grande do Norte e São Paulo). Da Bolívia, foram recebidas amostras de Cochabamba, do Paraguai, de Assunção e do México, de Vera Cruz. Os exemplares foram coletados em frutos e/ou armadilhas instaladas em pomares (Figura 1). Foram estudadas amostras de *A. alveata*, *A. manihoti*, *A. montei*, *A. pickeli* e *A. spatulata*, além de duas espécies não descritas (*Anastrepha* n. sp. 2 e *Anastrepha* n. sp. 3).

Figura 1 - Locais das populações de espécies do grupo *spatulata*; Bolívia, México, Paraguai e Brasil - estados do Amazonas (AM), Amapá (AP), Bahia (BA), Espírito Santo (ES), Minas Gerais (MG), São Paulo (SP) e Rio Grande do Norte (RN)

Inicialmente, as espécies foram identificadas com base no padrão alar, coloração do mesonoto e principalmente no formato e nas características do ápice do acúleo (ZUCCHI, 2000b), além da comparação com espécimes depositados na coleção da ESALQ/USP (Entomologia). Após confirmação da identificação, as fêmeas foram submetidas aos estudos morfométricos e moleculares.

2.2.2 Caracterização morfométrica

Os estudos de morfometria foram conduzidos no Laboratório de Taxonomia dos Insetos de Importância Agrícola do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP) em Piracicaba, SP e no Laboratório de Citogenética do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) em Ilhéus, BA.

As medidas morfométricas constam da análise de tamanho (morfometria tradicional) e da forma (morfometria geométrica) das estruturas. O acúleo e a asa direita foram selecionados para essas análises.

A morfometria geométrica baseia-se na marcação de pontos homólogos necessários para o estudo da forma. Por apresentar forma levemente convexa no ápice e ausência de segmentos com intersecção que auxiliem a marcação de pontos, o acúleo foi descartado dessa análise. Assim, foi feito o estudo morfométrico tradicional do acúleo e o geométrico da asa. Padronizou-se um número de 10 exemplares de cada espécie por localidade para as análises.

2.2.2.1 Morfometria tradicional

A análise de morfometria tradicional foi baseada no acúleo. Assim, o acúleo dos indivíduos de cada localidade foi extrovertido, separado da membrana eversível e tratado com hidróxido de sódio 10%, durante 24 h. Em seguida, foi montado em lâmina de microscopia com glicerina.

As análises morfométricas foram elaboradas em imagens digitalizadas obtidas pelo sistema de imagens da câmera Motic Image Plus 2.0[®], acoplada a um microscópio estereoscópico, usando-se o *software* Motic Images Advanced 3.2[®].

As variáveis (distâncias) analisadas no acúleo se encontram na figura 2.

Figura 2 - Acúleo de *A. pickeli* (Montes Claros, MG) contendo os *landmarks* (pontos) e as distâncias analisadas no *software* Motic Images Advanced 3.2[®]. 1 = Extremidade do ápice do acúleo 2 = final da abertura da cloaca; 3 e 4 = início da serra; 5 = linha indicativa do início da serra; 6 e 7 = linha indicativa do final da abertura da cloaca. As variáveis designadas foram: L1 = 1-2, comprimento do ápice do acúleo (final da abertura da cloaca até a extremidade ápice do acúleo); L2 = 3-4, largura do acúleo no início da serra; L3 = 2-5, distância entre o final da abertura da cloaca e o início da serra; L4 = 6-7, largura do acúleo no final da abertura da cloaca; L5 = 1-5, comprimento da serra

Além das cinco variáveis apresentadas na Figura 2, o comprimento total do acúleo também foi medido em um microscópio estereoscópico, Wild heerbrugg[®], acoplado ao aparelho de medidas modelo Wild MMS 235[®], sendo a sua variável designada como L6 (da base à extremidade do ápice do acúleo).

Por meio do programa Excel[®], as medidas morfométricas, de cada espécie, foram registradas e as médias calculadas para cada população amostrada.

2.2.2.2 Morfometria geométrica

A asa direita de cada indivíduo das espécies de *Anastrepha* foi retirada e posicionada entre duas lâminas de microscopia, para ser fotografada usando-se uma câmara fotográfica (modelo OSIS SC30) acoplada ao estereomicroscópio. A partir do *software* analySIS getIT (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH version 5.1), as imagens capturadas foram calibradas e separadas por localidade.

As imagens de cada localidade foram agrupadas utilizando-se o programa tpsUtil versão 1.4[®] (ROHLF, 2009a). Cada grupo de imagens foi aberto no programa tpsDig versão 2.12[®] (ROHLF, 2009b) visando a marcação de pontos. Foram marcados 14 marcos anatômicos (*landmarks*) nas intersecções das nervuras das asas de cada indivíduo das diferentes localidades (Figura 3), baseando-se em trabalhos com morfometria geométrica de *Anastrepha* (NASCIMENTO, 2005; SELIVON et al., 2005).

Figura 3 - Asa de *A. pickeli* (Natal, RN) mostrando os *landmarks* (pontos) do tipo 1, analisados no software tpsDig versão 2.12[®]: 1 = intersecção da nervura umeral com a costal; 2 = intersecção da nervura R_1 com a costal; 3 = intersecção da nervura R_{2+3} com a costal; 4 = intersecção da nervura R_{4+5} com a costal; 5 = intersecção da nervura M com a margem da asa; 6 = intersecção da nervura CuA_1 com a margem da asa; 7 = intersecção da nervura CuA_2 com a margem da asa; 8 = intersecção da nervura Cu_1 com a M; 9 = intersecção da nervura M com a bm-cu; 10 = intersecção da nervura Cu_1 cubital com a bm-cu; 11 = intersecção da nervura r-m com a R_{4+5} ; 12 = intersecção da nervura r-m com a M; 13 = intersecção da nervura dm-cu com a M; 14 = intersecção da nervura dm-cu com a CuA_1

Os arquivos gerados contendo as coordenadas posicionais de cada ponto marcado foram submetidos às análises do tamanho do centróide e de deformações relativas utilizando-se o *software* tpsRelw versão 1.46[®] (ROHLF, 2009c).

Para tanto, foi utilizado o critério de otimização para a superposição dos marcos anatômicos por meio do método de quadrados mínimos ortogonal generalizado executado pelo *software* tpsRelw versão 1.46[®] (ROHLF, 2009c). Na técnica da superposição são retirados os efeitos de tamanho, posição, orientação e os efeitos uniformes para ajustar uma configuração. A configuração representa o consenso entre os espécimes de todas as populações amostradas. Com esta configuração, pode-se calcular o tamanho do centróide que é representado pelo valor médio de todos os

pontos marcados no plano cartesiano. Este valor representa o centro geométrico da estrutura, que é fundamental para a definição de tamanho (MONTEIRO; REIS, 1999).

Por fim, os resultados dessas análises são as estimativas dos componentes uniformes e o cálculo das deformações. Esses conjuntos de variáveis são combinados e resultam em matrizes formadas por descritores geométricos da forma da asa. A partir da submissão da matriz de deformações parciais a métodos estatísticos multivariados, pode-se obter a matriz de deformações relativas, a qual descreve a organização da variação da forma da asa nas populações estudadas no espaço geográfico (ROHLF, 2008).

Portanto, a matriz de deformações relativas foi utilizada para realizar a análise de variáveis canônicas (Statística 9.0[®]) e obter o diagrama de deformações em grades utilizando-se o *software* tpsRegr versão 1.37[®] (ROHLF, 2009d).

Todos os programas tps foram obtidos gratuitamente no endereço eletrônico: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>.

Assim, as coordenadas referentes aos pontos marcados na asa direita dos indivíduos foram analisadas, utilizando-se um pacote de quatro programas específicos TPS por meio da estatística multivariada.

2.2.2.3 Análise de dados morfométricos

No estudo tradicional, os dados foram analisados por meio da estatística multivariada, a média das distâncias foi calculada e usada para análise de agrupamento, seguida da análise de componentes principais, para verificar quais as variáveis que mais contribuíram para o agrupamento. As diferenças entre as populações foram avaliadas usando-se o teste estatístico de Wilk's Lambda (Statística 9.0[®]).

Para a morfometria geométrica, também foi realizada a análise multivariada, MANOVA, sendo as populações avaliadas pelos testes estatísticos de Mann-Whitney (tamanho do centróide) e Wilk's Lambda (deformações relativas) utilizando-se o *software* Statística 9.0[®]. A matriz de distância de Mahalanobis também foi calculada, complementando as análises multivariadas.

Foram feitas avaliações interpopulacionais de cada espécie quando havia três ou mais populações de cada uma, além de um estudo envolvendo as espécies oriundas do estado de Minas Gerais por apresentar um maior número de espécies do grupo *spatulata*.

2.2.3 Caracterização molecular

Os estudos moleculares foram desenvolvidos nos Laboratório de Citogenética e Marcadores Moleculares e Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) em Ilhéus, BA.

2.2.3.1 Extração de DNA

Em razão do estado de conservação das amostras, três protocolos para a extração de DNA foram testados: o primeiro descrito em Han & McPheron (1997) utilizando fenol e clorofórmio, com uma etapa adicional, usando proteinase K (20 mg/mL) e incubação a 55°C por 5 min para espécimes preservados a seco ou em álcool; o segundo foi o Kit de extração “DNeasy Blood & Tissue kit” da QIAGEN® e o terceiro foi o método de extração salina (ALJANABI; MARTINEZ, 1997). O tórax e as pernas foram as estruturas utilizadas para realizar a extração do DNA.

2.2.3.2 Amplificação de fragmento do gene mitocondrial que codifica para a subunidade I da citocromo oxidase (COI) via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Um fragmento do gene mitocondrial que codifica para a subunidade I da citocromo oxidase (COI) foi selecionado para o estudo sobre as relações filogenéticas de espécies do grupo *spatulata*. Os *primers* utilizados para a amplificação da região da COI neste estudo foram: C1-J-2183 (CAACATTTATTTTGATTTTTTGG) (SPERLING & HICKEY, 1994) e TL2-N-3014 (TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA) (SIMON et al., 1994), que amplifica um fragmento de cerca de 872 pares de bases (pb) (Figura 4).

Figura 4 - Esquema de localização dos *primers* utilizados para amplificar os fragmentos de DNA da região citocromo oxidase I (COI) no estudo sobre as relações filogenéticas de espécies de *Anastrepha* do grupo *spatulata*

Outro par de *primer* que foi desenhado a partir da sequência de *Bactrocera abdominalis* (GenBank DQ917577), o tRNA-cys2 (ACTCCTTTAGAATTGCAGTCTAAT) e Cold-r (GGGCTCATACAATAATCCTAAT) (RUIZ-ARCE, 2009), que inclui parte do tRNA cisteína, tRNA tirosina e parte da subunidade I da citocromo oxidase, foi utilizado no estudo que envolve diferentes populações de *A. pickeli* e gera um fragmento de aproximadamente 1050 pb (Figura 5).

Figura 5 - Esquema de localização dos *primers* utilizados para amplificar os fragmentos de DNA da região citocromo oxidase I (COI) no estudo sobre as diferentes populações de *Anastrepha pickeli*

A amplificação do fragmento de DNA foi feita por meio da técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando-se um termociclador modelo Mastercycler da Eppendorf®. As reações foram realizadas em volume total de 25 µL de acordo com Gasparich et al. (1995). O volume de DNA utilizado variou de 3 a 5 µL para os espécimes que apresentaram dificuldades para amplificação. Em cada reação de PCR

realizada foi incluído um controle negativo. Posteriormente, as reações foram submetidas ao seguinte ciclo: Desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguidos de 39 ciclos de amplificação – 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min – e extensão final a 72°C por 10 min.

Após o término da PCR, foi feita a verificação dos fragmentos de DNA amplificados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (2,0 µg/µL). Os géis foram analisados utilizando-se um transiluminador com luz UV (~300nm) e fotografados utilizando-se o sistema Image Quant 350 (GE healthcare).

2.2.3.3 Reação de purificação do fragmento amplificado

Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se as enzimas exonuclease I de *Escherichia coli* (EXO I) e fosfatase alcalina de camarão (SAP) do fabricante Fermentas® seguindo as recomendações do fabricante. Somente os fragmentos dos genes que apresentaram uma concentração (estimada pelo uso do Low DNA Mass Ladder® da Invitrogen) de 20 a 25 ng de DNA/µl foram sequenciados.

2.2.3.4 Sequenciamento

As amostras (*forward* e *reverse*) amplificadas e purificadas foram enviadas para o Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (CEGH-USP) para a realização da reação de sequenciamento de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) código US81090. As sequências foram analisadas pelo *software* Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12.

2.2.3.5 Alinhamento e análise filogenética das sequencias do fragmento COI

As sequências foram analisadas e editadas utilizando-se o programa Bioedit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), versão 7.0.9® (disponível eletronicamente em, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Em seguida, foi realizado o alinhamento automático para ajustar as bases utilizando-se o programa específico

Clustal W Multiple Alignment (THOMPSON et al., 1994). A partir do alinhamento, foi gerada uma matriz para ser utilizada nas análises filogenéticas. O conjunto das sequências de DNA alinhadas foi analisado por diferentes métodos de reconstrução filogenética utilizando-se o programa MEGA 4.1[®] (TAMURA et al., 2008).

As análises foram conduzidas utilizando-se os métodos de máxima parcimônia (MP) e *neighbor-joining* (NJ).

2.2.3.6 Análise de máxima parcimônia

Para a construção das árvores filogenéticas, o arquivo com o alinhamento foi importado para o MEGA 4.1[®] e convertido em formato compatível (MEG). As árvores filogenéticas foram reconstruídas pelo método da máxima parcimônia utilizando-se busca heurística. Para a realização das análises foram utilizados *bootstrap* com 1000 replicações.

As sequências geradas foram comparadas com as sequências para o gene correspondente de *Anastrepha* spp. disponíveis no GenBank. *Anastrepha striata* Schiner (acesso: AF420651.1) e *Anastrepha serpentina* (Wiedemann) (acesso: AF420648.1) pertencentes ao grupo *serpentina*, foram selecionadas como grupo externo às espécies do grupo *spatulata*. No estudo que envolve as populações de *A. pickeli*, o grupo externo selecionado foi o mesmo, porém, nesse caso, os exemplares de *A. striata* e *A. serpentina* do estado do Amazonas (Manaus) foram sequenciados com o par de *primers* descrito em RUIZ-ARCE (2009).

Somente os pares de base que mostraram total sobreposição, após o alinhamento, foram considerados nas análises. O programa MEGA também foi utilizado para calcular a composição dos nucleotídeos e a matriz de divergência da sequência do gene analisado.

2.2.3.7 Análise de *neighbor-joining*

Com o arquivo contendo as sequências alinhadas e convertidas em formato compatível ao *software*, a árvore filogenética pelo método de *neighbor-joining* foi construída utilizando a distância Jukes-Cantor. O teste estatístico de *bootstrap*, que

proporciona confiabilidade dos ramos formados, também foi utilizado com 1.000 replicações nesse método.

2.3 Resultados e Discussão

Das espécies registradas no grupo, foi possível obter amostras de *A. alveata*, *A. manihoti*, *A. montei*, *A. pickeli* e *A. spatulata*, além de duas espécies não descritas (*Anastrepha* n. sp. 2 e *Anastrepha* n. sp. 3). Os caracteres morfológicos mais importantes para a identificação das espécies do grupo estão apresentados na Figura 6.

O número de amostras e das espécies estudadas em cada análise variou de acordo com a disponibilidade. As amostras de *A. pickeli* foram analisadas somente nos estudos que envolvem as espécies coletadas em Minas Gerais e na análise morfométrica e molecular sobre as populações dessa espécie.

Fonte: CANAL DAZA, 1997; SHAW, 1962; URAMOTO, 2007; ZUCCHI, 2000

Figura 6 - Principais caracteres morfológicos de espécies do grupo *spatulata* utilizados para a confirmação de amostras das espécies obtidas para este estudo. (a) Fêmea de *Anastrepha* (vista lateral); (b) Detalhe do escutelo (vista posterior), subescutelo e mediotergito amarelado e; (c) Ápices dos acúleos (vista ventral): (1) *A. pickeli*; (2) *Anastrepha* n. sp. 2; (3) *Anastrepha* n. sp. 3; (4) *A. spatulata*; (5) *A. manihoti*; (6) *A. alveata*; (7) *A. alveata* (vista lateral), (8) *A. montei* (em detalhe); (9) *A. montei*

2.3.1 Caracterização morfométrica

O número de exemplares de cada espécie, submetidos às análises de morfometria tradicional e geométrica, e respectivas localidade de coleta encontram-se na Tabela 1.

2.3.1.1 Morfometria tradicional

Devido a pouca disponibilidade de amostras ou a presença de exemplares danificados, somente as populações de *A. manihoti*, *Anastrepha* n. sp. 2, *Anastrepha* n. sp. 3 e as coletadas no estado de Minas Gerais foram analisadas, com exceção de *A. monteij*, que não pôde ser incluída devido ao acúleo extremamente fino.

a) *Anastrepha manihoti*

As populações foram coletadas nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais e na Bolívia. Foi possível verificar diferenças significativas (Wilk's Lambda, $P < 0,05$) entre as populações.

Tabela 1 - Número de exemplares das espécies de *Anastrepha* do grupo *spatulata* (Diptera, Tephritidae) de cada localidade e códigos das populações amostradas

(continua)

Espécies	Dados de coleta	Locais de coleta	Localização	Altitudes (m)	Preservação	¹ N	² M	³ D	Códigos (morfometria)	
									⁴ MT	⁵ MG
<i>A. alveata</i>										
	Armadilha McPhail	Santa Maria da Vitória, Bahia, Brasil	13°24' S 44°12' W	436	Etanol 100% (Freezer)	04	02	02	-	-
	Armadilha McPhail	Janaúba, Minas Gerais, Brasil	15°48' S 43°19' W	516	À seco	05	04	01	-	-
	Armadilha McPhail	Natal, Rio Grande do Norte, Brasil	05°47' S 35°13' W	30	Etanol 100% (Freezer)	14	10	00	-	-
	Armadilha McPhail	Vera Cruz, México	19°12' N 96°08' W	1400	Etanol 100% (Freezer)	05	04	01	-	-
<i>A. manihoti</i>										
	<i>Manihot esculenta</i>	Camamu, Bahia, Brasil	13°56' S 39°06' W	40	Etanol 100% (Freezer)	02	02	00	-	-
	Armadilha McPhail	Linhares, Espírito Santo, Brasil	19°24' S 40°04' W	33	Etanol 100% (Freezer)	10	10	00	MAES	
	<i>Manihot esculenta</i>	Janaúba, Minas Gerais, Brasil	15°48' S 43°19' W	516	Etanol 100% (Freezer)	10	10	00	MAMG	
	Armadilha McPhail	Conchal, São Paulo, Brasil	13°56' S 39°06' W	591	Etanol 100% (Freezer)	10	07	03	-	-
	Armadilha McPhail	Manaus, Amazonas, Brasil	03°06' S 60°01' W	92	Etanol 100% (Freezer)	01	01	00	-	-
	Armadilha McPhail	Cochabamba, Bolívia	17°38' S 66°15' W	2574	Etanol 100% (Freezer)	15	10	00	MABO	
<i>A. montei</i>										
	<i>Manihot esculenta</i>	Gandú, Bahia, Brasil	13°44' S 39°29' W	164	Etanol 100% (Freezer)	05	03	02	-	-
	Armadilha McPhail	Linhares, Espírito Santo, Brasil	19°24' S 40°04' W	33	Etanol 100% (Freezer)	15	10	00	-	MOES
	Armadilha McPhail	Janaúba, Minas Gerais, Brasil	15°48' S 43°19' W	516	Etanol 100% (Freezer)	15	10	00	-	MOMG
	Armadilha McPhail	Conchal, São Paulo, Brasil	13°56' S 39°06' W	591	Etanol 100% (Freezer)	10	10	00	-	MOSP

Tabela 1 - Número de exemplares das espécies de *Anastrepha* do grupo *spatulata* (Diptera, Tephritidae) de cada localidade e códigos das populações amostradas

(conclusão)

Espécies	Dados de coleta	Locais de coleta	Localização	Altitudes (m)	Preservação	¹ N	² M	³ D	Códigos (morfometria)	
									⁴ MT	⁵ MG
<i>A. pickeli</i>										
	<i>Manihot esculenta</i>	Macapá, Amapá, Brasil	00°02’S 51°03’ W	16	Etanol 100% (Freezer)	02	00	00	-	-
	<i>Manihot esculenta</i>	Teixeira de Freitas, Bahia, Brasil	18°06’S, 39°53’W	186	Etanol 100% (Freezer)	13	10	00	APBA	
	Armadilha McPhail	Linhares, Espírito Santo, Brasil	19°24’ S 40°04’ W	33	Etanol 100% (Freezer)	10	10	00	APES	
	Armadilha McPhail	Janaúba, Minas Gerais, Brasil	15°48’ S 43°19’ W	516	Etanol 100% (Freezer)	15	10	00	APMG	
	Armadilha McPhail	Natal, Rio Grande do Norte, Brasil	05°47’S 35°13’ W	30	Etanol 100% (Freezer)	10	10	00	APRN	
	Armadilha McPhail	Conchal, São Paulo, Brasil	13°56’S 39°06’ W	591	Etanol 100% (Freezer)	10	10	00	APSP	
	Armadilha McPhail	Manaus, Amazonas, Brasil	03°06’S 60°01’W	92	Etanol 100% (Freezer)	10	10	00	APAM	APMA
	Armadilha McPhail	Cochabamba, Bolívia	17°38’S 66°15’W	2574	Etanol 100% (Freezer)	15	10	00	APBO	
	Armadilha McPhail	Assunção, Paraguai	25°26’S 57°66’W	55	Etanol 100% (Freezer)	15	10	00	APPA	
<i>A. spatulata</i>										
	Armadilha McPhail	Vera Cruz, México	19°12’ N 96°08’ W	1400	Etanol 100% (Freezer)	03	02	01	-	-
<i>Anastrepha</i> n. sp. 2										
	Armadilha McPhail	Janaúba, Minas Gerais, Brasil	15°48’ S 43°19’ W	516	Etanol 100% (Freezer)	15	10	00	MGSB	
<i>Anastrepha</i> n. sp. 3										
	Armadilha McPhail	Janaúba, Minas Gerais, Brasil	15°48’ S 43°19’ W	516	Etanol 100% (Freezer)	15	10	00	MGSC	
	Armadilha McPhail	Natal, Rio Grande do Norte, Brasil	05°47’S 35°13’ W	30	Etanol 100% (Freezer)	15	10	00	RNSC	

¹N - Número de exemplares

²M - Número de exemplares submetidos à morfometria

³D - Número de exemplares com a asa direita danificada

⁴MT - Código das populações submetidas à técnica de morfometria tradicional

⁵MG - Código das populações submetidas à técnica de morfometria geométrica

A análise de componentes principais revelou que as variáveis L2 (largura do acúleo no início da serra), L3 (distância do final da abertura da cloaca ao início da serra) e L5 (comprimento da serra) explicaram 52,4% para a variabilidade dos dados, observando-se o agrupamento da população da Bolívia com Minas Gerais e a separação da população do Espírito Santo das demais populações (Figura 7).

Figura 7 - Dendrograma para populações de *Anastrepha manihoti* do Espírito Santo (MAES), Minas Gerais (MAMG) e Bolívia (MABO) gerado a partir das distâncias no acúleo pela análise de agrupamento (UPGMA)

b) *Anastrepha* n. sp. 2 e *Anastrepha* n. sp. 3

As populações de *Anastrepha* n. sp. 3 foram coletadas nos estados de Minas Gerais e Rio Grande do Norte. Uma população de *Anastrepha* n. sp. 2 de Minas Gerais também foi inserida nessa comparação. As populações apresentaram diferenças significativas (Wilk's Lambda, $P < 0,05$) entre as populações de *Anastrepha* n. sp. 2 e *Anastrepha* n. sp. 3. Quando submetidas à análise de componentes principais, verificou-se que as variáveis L1 (comprimento do ápice do acúleo) e L5 (comprimento da serra) explicaram 96,0% para a variabilidade dos dados, observando-se o agrupamento entre as populações de *Anastrepha* n. sp. 3 de Minas Gerais e Rio Grande do Norte, que se separaram da população de *Anastrepha* n. sp. 2 de Minas Gerais (Figura 8).

Figura 8 - Dendrograma para populações de *Anastrepha* sp. 2 de Minas Gerais (MGSB) e *Anastrepha* sp. 3. de Minas Gerais e Rio Grande do Norte (MGSC e RNSC) gerado a partir das distâncias no acúleo por análise de agrupamento (UPGMA)

c) Espécies do grupo *spatulata* do estado de Minas Gerais

Em Minas Gerais, foi obtido o maior número de espécies do grupo: *A. pickeli*, *A. manihoti*, incluindo as espécies novas (*Anastrepha* n. sp. 2 e *Anastrepha* n. sp. 3). Assim, foi feito um estudo com o objetivo de comparar as espécies coletadas nesse estado.

Três grupos foram formados e houve diferença significativa entre as populações (Wilk's Lambda, $P < 0,05$). As variáveis L1 (comprimento do ápice do acúleo), L2 (largura do acúleo no início da serra), L4 (largura do acúleo no final da abertura da cloaca) e L5 (comprimento da serra) contribuíram com 73,7% dos grupos formados, de acordo com a análise de componentes principais. Verificou-se que a população de *Anastrepha* n. sp. 3 separou-se das demais e *Anastrepha* n. sp. 2 agrupou-se com *A. pickeli* formando um clado. Verificou-se que *A. manihoti* formou um grupo distinto (Figura 9).

Figura 9 - Dendrograma para populações de fêmeas de *Anastrepha manihoti*, *Anastrepha pickeli*, *Anastrepha* sp. 2 e *Anastrepha* sp. 3. de Minas Gerais (MAMG, APMG, MGSC e MGSC), gerado a partir das distâncias no acúleo por análise de agrupamento (UPGMA)

A MANOVA para *A. manihoti*, *Anastrepha* n. sp. 2, *Anastrepha* n. sp. 3 e espécies coletadas em Minas Gerais, para a morfometria tradicional, revelou diferenças significativas (Wilk's Lambda, $P < 0,0001$) quanto à análise de tamanho do acúleo.

2.3.1.2 Morfometria geométrica

Para a análise da forma, verificou-se a similaridade das populações quanto ao tamanho do centróide e às deformações relativas das populações de cada espécie. Assim, foi possível estudar as populações de *A. manihoti*, *A. montei*, *Anastrepha* n. sp. 2, *Anastrepha* n. sp. 3, além de um estudo específico com populações do estado de Minas Gerais, onde foi obtido o maior número de espécies.

2.3.1.2.1 Análise do tamanho do centróide

Foram estudadas as populações de *A. manihoti*, *A. montei*, *Anastrepha* n. sp. 2, *Anastrepha* n. sp. 3, além de um estudo específico com populações do estado de Minas Gerais.

a) *Anastrepha manihoti*

As populações de *A. manihoti* apresentaram diferenças significativas entre as populações da Bolívia e Minas Gerais (Mann-Whitney, $P < 0,05$), ao contrário do observado entre Bolívia e Espírito Santo, as quais não se diferenciaram estatisticamente (Mann-Whitney, $P > 0,05$). Os valores médios e desvio-padrão do tamanho do centróide, calculados para as populações de *A. manihoti*, encontram-se na Figura 10.

Figura 10 - Valores médios e desvio-padrão do tamanho do centróide das asas de fêmeas das populações de *Anastrepha Manihoti* do Espírito Santo (MAES), Minas Gerais (MAMG) e Bolívia (MABO)

Para se verificar a similaridade entre as populações, foi construído um dendrograma (Figura 11), mostrando o agrupamento das amostras por UPGMA baseado na distância Euclidiana.

Ao analisar os pares de populações, verificou-se que o Espírito Santo apresentou uma distância de 0,01 com relação às demais populações e a Bolívia apresentou uma maior distância (0,02) com a população de Minas Gerais.

Figura 11 - Dendrograma por distância euclidiana para as populações de *Anastrepha Manihoti* do Espírito Santo (MAES), Minas Gerais (MAMG) e Bolívia (MABO) gerado a partir dos 14 pontos marcados na asa.

As populações de *A. manihoti* dos estados do Espírito Santo e de Minas Gerais agruparam-se e ficaram separadas da população da Bolívia. Diferentemente do resultado obtido com a análise do acúleo para as mesmas populações, na qual os indivíduos do Espírito Santo ficaram separados das demais populações.

b) *Anastrepha montei*

As populações de *A. montei* foram coletadas nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo. As populações de *A. montei* diferiram entre si no nível de 95% de confiança (Mann-Whitney, $P < 0,05$). Os valores médios e desvio-padrão das populações de *A. montei*, encontram-se representados graficamente na Figura 12.

A distância entre os pares de populações variou de 0,01 a 0,02. A população de Minas Gerais apresentou a menor distância (0,01) com a população de São Paulo e a população do Espírito Santo apresentou a maior distância (0,02) com as populações de Minas Gerais e São Paulo.

Figura 12 - Valores médios e desvio-padrão do tamanho do centróide das asas de fêmeas das populações de *Anastrepha monteí* do Espírito Santo (MOES), Minas Gerais (MOMG) e São Paulo (MOSP)

Verificou-se o agrupamento das populações dos estados de São Paulo e Minas Gerais, que ficaram separadas da população do Espírito Santo (Figura 13).

Figura 13 - Dendrograma por distância Euclidiana para as populações de *Anastrepha Monteí* do Espírito Santo (MOES), Minas Gerais (MOMG) e São Paulo (MOSP) gerado a partir dos 14 pontos marcados na asa.

c) *Anastrepha* n. sp.2 e *Anastrepha* n. sp.3

As populações de *Anastrepha* n. sp. 3 de Minas Gerais e Rio Grande do Norte não diferiram entre si (Mann-Whitney, $P > 0,05$), porém diferiram estatisticamente da população de *Anastrepha* n. sp. 2 de Minas Gerais (Mann-Whitney, $P < 0,05$). Os valores médios e desvio-padrão, calculados para as populações, encontram-se na Figura 14.

Figura 14 - Valores médios e desvio-padrão do tamanho do centróide das asas de fêmeas das populações de *Anastrepha* n. sp. 2 de Minas Gerais (MGSC) e *Anastrepha* n. sp. 3 do estado de Minas Gerais (MGSB) e Rio Grande do Norte (RNSC)

Anastrepha n. sp. 3 dos estados de Minas Gerais e Rio Grande do Norte agruparam-se e ficaram separadas de *Anastrepha* n. sp. 2 (Figura 15).

As populações de *Anastrepha* n. sp. 3 apresentaram uma distância de 0,01 entre si, enquanto que a população de *Anastrepha* n. sp. 2 distanciou-se das demais com uma distância de 0,02.

Figura 15 - Dendrograma por distância euclidiana para as populações de *Anastrepha* n. sp. 2 de Minas Gerais (MGSB) e *Anastrepha* n. sp.3 do estado de Minas Gerais (MGSC) e do Rio Grande do Norte (RNSC) gerado a partir dos 14 pontos marcados na asa.

d) Espécies do grupo *spatulata* do estado de Minas Gerais

Em Minas Gerais, foi obtido o maior número de espécies do grupo: *A. pickeli* (APMG), *A. montei* (MOMG), *A. manihoti* (MAMG), incluindo as espécies novas – a *Anastrepha* n. sp. 2 (MGSB) e *Anastrepha* n. sp. 3 (MGSC). Assim, foi feito um estudo com o objetivo de comparar o tamanho do centróide das espécies coletadas nesse estado (Figura 16). Foi possível verificar diferença significativa entre as espécies (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Por meio do dendrograma, verificou-se a separação de *A. manihoti* das demais espécies, sendo um grupo formado por *A. pickeli*, *Anastrepha* n. sp. 3, *A. montei* e *Anastrepha* n. sp. 2, enfatizando o grupo formado por *A. montei* e *Anastrepha* n. sp. 2 (Figura 17).

Figura 16 - Valores médios e desvio-padrão do tamanho do centróide das asas de fêmeas das populações das espécies do grupo *spatulata* do estado de Minas Gerais (Brasil): *Anastrepha manihoti* (MAMG), *Anastrepha montei* (MOMG), *Anastrepha* n. sp. 3 (MGSC), *Anastrepha pickeli* (APMG) e *Anastrepha* n. sp. 2 (MGSB)

As maiores distâncias foram verificadas entre a população de *A. manihoti* e as populações de *A. montei*, *Anastrepha* n. sp. 3 e *A. pickeli* com o valor de 0,03. A menor distância observada (0,02), ocorreu entre a população de *Anastrepha* n. sp. 2 e as demais espécies.

Figura 17 - Dendrograma por distância euclidiana para cinco espécies do grupo *spatulata*, coletadas no estado de Minas Gerais (Brasil): *Anastrepha manihoti* (MAMG), *Anastrepha montei* (MOMG), *Anastrepha* n. sp. 3 (MGSC), *Anastrepha pickeli* (APMG) e *Anastrepha* n. sp. 2 (MGSB) gerado a partir dos 14 pontos marcados na asa.

As populações de *A. manihoti*, *A. pickeli*, *Anastrepha* n. sp. 2 e *Anastrepha* n. sp. 3 de Minas Gerais apresentaram resultado diferenciado na análise de agrupamento do tamanho do centróide quando comparado à análise de agrupamento referente ao tamanho do acúleo. Esse fato pode ter ocorrido devido à inclusão de *A. montei* na análise do tamanho da asa (tamanho do centróide).

Com os resultados obtidos, verificou-se que o tamanho do centróide é útil para a distinção interpopulacional de espécies do grupo *spatulata*. Além disso, foi possível confirmar que *Anastrepha* n. sp. 2 é uma espécie que se distingue significativamente de *Anastrepha* n. sp. 3, tanto na análise que envolve o tamanho do acúleo como no tamanho da asa.

2.3.1.2.2 Análise de deformações relativas

A partir das matrizes de deformações relativas (*relative warps*), obtidas no programa tpsRelw versão 1.46[®] (ROHLF, 2009), foi feita a análise de variáveis canônicas (VC) no programa Statistica 9.0[®]. Apenas as duas primeiras variáveis canônicas geradas foram consideradas para a interpretação, já que são, por definição, as mais informativas (MONTEIRO; REIS, 1999). A partir da regressão da variável canônica sobre os componentes de forma, em cada comparação, foi feito o estudo de deformações em diagramas de grade com o uso do programa tpsRegr versão 1.37[®] (ROHLF, 2009), que se encontram ao redor dos gráficos das variáveis canônicas. Esta análise foi feita a partir de *scores* das médias populacionais das variáveis canônicas, computadas a partir das variáveis de forma, que foram projetadas no espaço entre as variáveis canônicas em gráficos bidimensionais de dispersão que permitem visualizar a ordenação das populações em relação às variações de forma das asas analisadas. Os diagramas de deformação indicam a conformação alar dos indivíduos conforme os valores das variáveis canônicas ao longo dos eixos dessas variáveis, ou seja, quanto mais próximo dos extremos dos eixos das variáveis canônicas estiver o indivíduo, as asas terão maior semelhança àquela conformação externa.

Por fim, as deformações representam quais as principais dissimilaridades, quanto à posição dos pontos anatômicos entre as configurações alares submetidas à comparação. Assim, as populações que se localizam nos eixos que apresentam *score*

negativo estão mais próximas da conformação alar apresentada pelas variáveis canônicas VC 1 e VC 2 extremo inferior ao contrário das populações que se localizam nos eixos que apresentam *score* positivo, estando mais próximas da conformação alar apresentada pelas variáveis canônicas VC 1 e VC 2 extremo superior.

Um total de 24 deformações relativas foi gerado ($k = 2n - 4$), onde k representa o número de deformações relativas e n o número de *landmarks*. A MANOVA indicou que os eixos canônicos foram estatisticamente significativos (Wilk's Lambda $P < 0,0001$), indicando diferença na conformação alar das populações estudadas.

a) *Anastrepha manihoti*

Os gráficos de dispersão de variáveis canônicas das populações de *A. manihoti*, *A. montei*, *Anastrepha* n. sp. 2 e *Anastrepha* n. sp. 3 apresentaram semelhanças com relação às diferenças significativas encontradas e separação total das populações oriundas de diferentes regiões (Figuras 18, 19 e 20).

A população de *A. manihoti* do estado de Minas Gerais localizou-se mais próximo ao eixo da VC 1: extremo inferior (*score* negativo), logo a conformação alar desses indivíduos será hipoteticamente conforme a forma apresentada neste diagrama. Nessa conformação observa-se um alongamento da asa na intersecção da nervura Cu_1 com a M (*landmark* 8) à intersecção da nervura M com a margem da asa (*landmark* 5). Além disso, alguns indivíduos desta população, localizaram-se no extremo inferior da VC 2 (Figura 16). A população do Espírito Santo localizou-se no extremo superior da VC 2 (*score* positivo) ao contrário da população da Bolívia que localizou-se entre os extremos superiores das variáveis canônicas VC 2 e VC 1 (*scores* positivos) (Figura 16). Alguns indivíduos da população da Bolívia, apresentaram-se com um estreitamento da asa verificado entre a intersecção da nervura CuA_2 com a margem da asa (*landmark* 7) e a intersecção da nervura R_{4+5} com a costal (*landmark* 4) (VC 1: extremo superior). Como o primeiro eixo canônico explicou 97,20% da variação entre as populações de *A. manihoti*, isso indica que as populações estão ordenadas em um contínuo de variação na forma da asa ao longo desse primeiro eixo. A MANOVA indicou diferenças significativas entre as populações de *A. manihoti* (Wilk's Lambda $P < 0,0001$).

Figura 18 - Gráfico de dispersão de fêmeas de *Anastrepha manihoti* do estado do Espírito Santo (MAES), Minas Gerais (MAMG) e Bolívia (MABO) no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas após a análise de coordenadas posicionais em plano cartesiano de 14 pontos anatômicos da asa. Os diagramas de deformações ao redor do gráfico indicam as conformações alares presumíveis para indivíduos situados no extremo superior e inferior das variáveis canônicas. As magnitudes das deformações foram aumentadas em 3X para visualização

b) *Anastrepha montei*

Para as populações de *A. montei*, foi possível verificar que o primeiro eixo canônico explica 95,11% da variação entre as populações. A população de Minas Gerais localizou-se no extremo inferior da variável canônica 1 (score negativo), a qual indicou uma base mais larga verificada da intersecção da nervura CuA₂ com a margem da asa (*landmark 7*) à intersecção da nervura M com a margem da asa (*landmark 5*). A população de São Paulo localizou-se ao extremo superior da variável canônica 2 (score positivo), a qual apresentou um leve estreitamento verificado na intersecção da nervura M com a margem da asa (*landmark 5*) à intersecção da nervura CuA₂ com a margem da asa (*landmark 7*). A população do Espírito Santo se dividiu entre os extremos superiores das variáveis canônicas VC 1 e VC 2 (scores positivos) (Figura 19). Apresentando indivíduos com a forma alar dos diagramas verificados na VC 1: extremo superior e VC 2: extremo superior. Assim, cabe ressaltar que as deformações hipotéticas ao longo deste primeiro eixo canônico representam uma possível mudança na forma da asa, prevista na variação dos escores dos dois primeiros eixos canônicos. A MANOVA indicou diferenças significativas entre as populações de *A. montei* (Wilk's Lambda $P < 0,0001$).

Figura 19 - Gráfico de dispersão de fêmeas de *Anastrepha montei* do estado do Espírito Santo (MOES), Minas Gerais (MOMG) e São Paulo (MOSP) no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas após a análise de coordenadas posicionais em plano cartesiano de 14 pontos anatômicos da asa. Os diagramas de deformações ao redor do gráfico indicam as conformações alares presumíveis para indivíduos situados no extremo superior e inferior das variáveis canônicas. As magnitudes das deformações foram aumentadas em 3X para visualização

c) *Anastrepha* n. sp. 2 e *Anastrepha* n. sp. 3

Para as populações de *Anastrepha* n. sp. 2 e *Anastrepha* n. sp. 3, o primeiro eixo canônico explicou 69,50% da variação entre as populações. As populações separaram-se totalmente, sendo que a população de *Anastrepha* n. sp. 2 do estado de Minas Gerais localizou-se nos extremos inferior das variáveis canônicas 1 e 2 (*score* negativo), enquanto que a população *Anastrepha* n. sp. 3 do estado de Minas Gerais posicionou-se no extremo superior da variável canônica 1 (*score* positivo), a qual apresentou leve alongamento da asa da intersecção da nervura Cu_1 com a M (*landmark* 8) à intersecção da nervura R_{4+5} com a costal (*landmark* 4), apresentando-se levemente côncava. A população do Rio Grande do Norte localizou-se ao extremo superior da VC 2 (*score* positivo), no qual o diagrama indicou um estreitamento verificado entre as intersecções da nervura R_{2+3} com a costal (*landmark* 3), a nervura R_{4+5} com a costal (*landmark* 4) e a nervura M com a margem da asa (*landmark* 5) (Figura 20). A MANOVA indicou diferenças significativas entre as populações de *Anastrepha* n. sp. 2 e *Anastrepha* n. sp. 3 (Wilk's Lambda $P < 0,0001$).

Figura 20 - Gráfico de dispersão de fêmeas de *Anastrepha* n. sp. 3 do estado de Minas Gerais (MGSC), Rio Grande do Norte (RNSC) e *Anastrepha* n. sp. 2 de Minas Gerais (MGSB) no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas após a análise de coordenadas posicionais em plano cartesiano de 14 pontos anatômicos da asa. Os diagramas de deformações ao redor do gráfico indicam as conformações alares presumíveis para indivíduos situados no extremo superior e inferior das variáveis canônicas. As magnitudes das deformações foram aumentadas em 3X para visualização

d) Espécies do grupo *spatulata* do estado de Minas Gerais

Foi verificada a separação das espécies do grupo. O primeiro eixo canônico explicou 48,80% da variação entre as populações. As populações de *A. montei* e *Anastrepha* n. sp. 3 mostraram uma leve sobreposição (10%) apresentada no extremo superior da VC 1. Este fato pode estar associado ao maior tamanho das asas apresentado por essas espécies, as quais apresentaram alongamento visível nas intersecções da nervura CuA₂ com a margem da asa (*landmark* 7), da nervura M com a margem da asa (*landmark* 5) e da intersecção da nervura R₄₊₅ com a costal (*landmark* 4). As demais espécies separaram-se distintamente nos extremos das variáveis canônicas e os diagramas mostraram total distinção na diferença da forma das asas das respectivas espécies (Figura 21). *Anastrepha* n. sp. 2 apresentou-se dividida entre o extremo superior da VC 1 e extremo inferior da VC 2 com alguns indivíduos localizados próximo ao extremo superior da VC 2. A população de *A. manihoti* apresentou resultado curioso localizando-se nos extremos inferior da VC 1 e VC 2 (*score* negativo), no qual a asa apresenta-se visivelmente com menor tamanho, estreitando-se levemente da intersecção da nervura CuA₂ com a margem da asa (*landmark* 7) à intersecção da nervura Cu₁ com a M (*landmark* 8) (VC 1: extremo inferior). Porém, alguns indivíduos localizaram-se mais próximos da VC 2: extremo inferior, no qual o diagrama mostra uma forma alar mais alongada, fato que corrobora com o resultado obtido na análise de deformações das populações de *A. manihoti* na qual a população de Minas Gerais apresentou-se com semelhante deformação (forma alongada) (ver Figura 18, VC 1 e VC 2: extremo inferior). *A. pickeli* localizou-se no extremo superior da VC 2 (*score* positivo). A MANOVA indicou diferenças significativas entre as diferentes populações (Wilk's Lambda $P < 0,0001$).

Figura 21 - Gráfico de dispersão de fêmeas de cinco espécies do grupo *spatulata* oriundas do estado de Minas Gerais: *Anastrepha manihoti* (MAMG), *Anastrepha montei* (MOMG), *Anastrepha* n. sp. 3 (MGSC), *Anastrepha pickeli* (APMG) e *Anastrepha* n. sp. 2 (MGSB) no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas após a análise de coordenadas posicionais em plano cartesiano de 14 pontos anatômicos da asa. Os diagramas de deformações ao redor do gráfico indicam as conformações alares presumíveis para indivíduos situados no extremo superior e inferior das variáveis canônicas. As magnitudes das deformações foram aumentadas em 3X para visualização

Os resultados obtidos com a MANOVA das análises de morfometria convergem na diferenciação significativa das populações estudadas. O tamanho do acúleo, do centróide e a forma da asa permitiu verificar que as populações de *Anastrepha* n. sp. 2 e *Anastrepha* n. sp. 3 são espécies distintas de *A. pickeli* e que ambas diferenciam-se entre si. O comprimento do ápice do acúleo (L1) juntamente com a largura do acúleo no final da abertura da cloaca (L4) e o comprimento da serra (L5) foram as distâncias que mais contribuíram para a diferenciação das populações analisadas. Os marcos (*landmarks*) que mais contribuíram para as deformações alares visualizadas nos diagramas em grades foram correspondentes às intersecções da nervura R_{4+5} com a nervura costal (*landmark* 4), da nervura M com a margem da asa (*landmark* 5), da nervura CuA_2 com a margem da asa (*landmark* 7) e da nervura Cu_1 com a M (*landmark* 8).

2.3.2 Relações filogenéticas de espécies de *Anastrepha* do grupo *spatulata* inferidas com base em sequências do gene COI

Os melhores resultados para a extração de DNA total das amostras foram obtidos com o protocolo descrito em Han & McPheron (1997). Em razão da má conservação das amostras, foram obtidas poucas sequências de qualidade. O número de exemplares obtido para cada espécie e sua respectiva localidade de coleta encontra-se na Tabela 2. Somente uma sequência por espécie de cada localidade foi utilizada nas análises.

A partir do alinhamento das 15 sequências editadas, incluindo aquelas do grupo externo, foi gerada uma matriz com 749 caracteres (pares de bases) que foi utilizada nos métodos de reconstrução filogenética (máxima parcimônia e *neighbor-joining*). O alinhamento das sequências encontra-se no anexo.

Tabela 2 - Número de exemplares de cada espécie de *Anastrepha* e localidades de coleta

Espécies	Dados de coleta	Locais de coleta	Localização	Altitudes (m)	Preservação	Amostras sequeenciadas (n)
<i>A. alveata</i>						
	Armadilha McPhail	Santa Maria da Vitória, Bahia, Brasil	13°24' S 44°12' W	436	Etanol 100% (Freezer)	1
	Armadilha McPhail	Vera Cruz, México	19°12' N 96°08' W	1400	Etanol 100% (Freezer)	1
<i>A. manihoti</i>						
	<i>Manihot esculenta</i>	Camamu, Bahia, Brasil	13°56'S 39°06' W	40	Etanol 100% (Freezer)	1
	<i>Manihot esculenta</i>	Manaus, Amazonas, Brasil	03°06'S 60°01'W	92	Etanol 100% (Freezer)	1
<i>A. montei</i>						
	<i>Manihot esculenta</i>	Gandú, Bahia, Brasil	13°44'S 39°29' W	164	Etanol 100% (Freezer)	1
	Armadilha McPhail	Conchal, São Paulo, Brasil	13°56'S 39°06' W	591	Etanol 100% (Freezer)	1
<i>A. pickeli</i>						
	<i>Manihot esculenta</i>	Macapá, Amapá, Brasil	00°02'S 51°03' W	16	Etanol 100% (Freezer)	1
	<i>Manihot esculenta</i>	Teixeira de Freitas, Bahia, Brasil	18°06'S, 39°53'W	186	Etanol 100% (Freezer)	1
	Armadilha McPhail	Natal, Rio Grande do Norte, Brasil	05°47'S 35°13' W	30	Etanol 100% (Freezer)	1
	<i>Manihot esculenta</i>	Manaus, Amazonas, Brasil	03°06'S 60°01'W	92	Etanol 100% (Freezer)	1
	Armadilha McPhail	Assunção, Paraguai	25°26'S 57°66'W	55	Etanol 100% (Freezer)	1
<i>A. spatulata</i>						
	Armadilha McPhail	Vera Cruz, México	19°12' N 96°08' W	1400	Etanol 100% (Freezer)	1
<i>Anastrepha</i> n. sp. 2						
	Armadilha McPhail	Janaúba, Minas Gerais, Brasil	15°48' S 43°19' W	516	Etanol 100% (Freezer)	1
<i>A. serpentina</i>						
	GenBank: AF420648					
<i>A. striata</i>						
	GenBank: AF420651					

2.3.2.1 Análise de máxima parcimônia

A matriz de COI gerada contendo 749 caracteres apresentou 231 sítios variáveis, o que corresponde a 30,84% dos pares de bases. Desses, 130 foram informativos para a análise de parcimônia e 514 sítios conservados. A análise de máxima parcimônia resultou em duas árvores mais parcimoniosas. A árvore de consenso estrito está apresentada na Figura 22.

Figura 22 - Relações filogenéticas entre populações de espécies do grupo *spatulata* inferidas de acordo com a árvore de consenso estrito gerada pelo método da máxima parcimônia, com *bootstrap* de 1.000 replicações representados pelos números nos ramos. A figura contém somente os valores de *bootstrap* acima de 50%. Comprimento da árvore: 315 passos, índice de consistência (C.I.) de 0,78 e índice de retenção (R.I.) de 0,80

A árvore de consenso estrito obtida pela análise de máxima parcimônia (Figura 22) mostra que as populações de *A. pickeli* apresentam-se com um clado formado por exemplares do Paraguai (PRY), Macapá (AP), Manaus (AM), Natal (RN) e Vitória da Conquista (BA), apresentando um alto suporte de *bootstrap* de 99%. *Anastrepha* n. sp. 2 (MG) aparece próxima do grupo formado pelas populações de *A. pickeli*. As populações de *A. manihoti* de Camamu (BA) e Manaus (AM) agruparam-se formando um clado, assim como, também as populações de *A. alveata* de Vera Cruz (ME) e Santa Maria da Vitória (BA) formaram outro grupo, com suporte de 100% e 99% de *bootstrap*, respectivamente. Apesar da grande diferença morfológica no ápice do acúleo, *Anastrepha spatulata* apresenta-se geneticamente como grupo irmão de *A. montei* de Gandú (BA) e Conchal (SP).

2.3.2.2 Análise de *neighbor-joining*

A matriz de COI contendo os 749 caracteres foi analisada pelo método de *neighbor-joining* utilizando-se a distância de Jukes-Cantor. A árvore de consenso estrito, construída a partir das três árvores mais parcimoniosas, está representada na Figura 23.

Figura 23 - Relações filogenéticas inferidas entre espécies do grupo *spatulata* inferidas pela árvore de consenso estrito gerada pelo método de *neighbor-joining* com a distância Jukes-Cantor. Os números nos ramos representam os valores de *bootstrap* encontrados a partir de 1.000 replicações. A figura contém somente os valores de *bootstrap* acima de 50%. Comprimento da árvore: 315 passos, índice de consistência (C.I.) de 0,78 e índice de retenção (R.I.) de 0,80

A árvore filogenética obtida pela análise de *neighbor-joining* (Figura 23) apresentou uma topologia semelhante à árvore gerada pela análise de máxima parcimônia (Figura 22), onde *Anastrepha* n. sp. 2 apresentou-se mais próxima das populações de *A. pickeli* que aparecem como um clado monofilético. *Anastrepha spatulata* foi inserida no mesmo clado que as populações de *A. montei* de Gandú (BA) e Conchal (SP). No estudo filogenético realizado com sequências do 16S rRNA do DNA mitocondrial, a posição de *A. montei* foi diferente nas árvores geradas pelos métodos de máxima parcimônia e *neighbor-joining* (MCPHERON et al., 1999), entretanto, no presente estudo não houve diferença de *A. montei* em ambas análises. No mesmo estudo envolvendo diferentes grupos de *Anastrepha*, *A. spatulata* ficou mais próxima do grupo *fraterculus* e quando submetida à análise da máxima parcimônia (MP), foi incluída no grupo formado por espécies do grupo *pseudoparalella* (MCPHERON et al., 1999), também se relatou a separação de *A. spatulata* das demais espécies do grupo, *i. e.*, *A. montei*, *A. pickeli*, *A. alveata* e *A. manihoti* (MCPHERON et al., 1999). Barr et al. (2005), analisando o gene *period*, verificaram que *A. spatulata* posicionou-se próxima das demais espécies do grupo porém, não ficou agrupada com as referidas espécies. Neste trabalho, *A. spatulata* é agrupada com *A. montei*, cuja posição não foi diferente nas árvores geradas por MP e NJ.

A distância média entre as populações foi de $0,090 \pm 0,036$. O nível de divergência nas sequências variou de um mínimo de 0,001 para uma máxima distância de 0,156 entre as populações. Apesar da diferença geográfica, as populações que apresentaram a menor distância observada dentro das populações (0,001) foi entre as populações de *A. pickeli* do Paraguai e do Amapá e o maior nível de divergência genética (0,156) foi verificado entre as populações de *A. pickeli* de Vitória da Conquista e *A. spatulata*. (Tabela 3).

Tabela 3 - Matriz de distância genética entre as sequências da região COI das espécies de *Anastrepha*

	<i>A.alveata</i> , Vera Cruz, ME	<i>A. alveata</i> , Santa Maria da Vitória, BA, BRA	<i>A. spatulata</i> , Vera Cruz, ME	<i>A.pickeli</i> , Manaus, AM, BRA	<i>A. pickeli</i> , Natal, RN, BRA	<i>A.pickeli</i> , Vitória da Conquista, BA, BRA	<i>A.pickeli</i> , Asuncion, PRY	<i>A. pickeli</i> , Macapá, AP, BRA	<i>A. montei</i> , Gandú, BA, BRA	<i>A. montei</i> , Conchal, SP, BRA	<i>A. n. sp. 2</i> , Janaúba, MG, BRA	<i>A. manihoti</i> , Camamu, BA, BRA	<i>A. manihoti</i> , Manaus, AM, BRA	<i>A. serpentina</i> clone dna38	<i>A. striata</i> clone dna41
<i>A. alveata</i> , Vera Cruz, ME	0.000														
<i>A. alveata</i> , Santa Maria da Vitória, BA, BRA	0.024	0.000													
<i>A. spatulata</i> , Vera Cruz, ME	0.082	0.079	0.000												
<i>A. pickeli</i> , Manaus, AM, BRA	0.091	0.098	0.111	0.000											
<i>A. pickeli</i> , Natal, RN, BRA	0.125	0.132	0.144	0.054	0.000										
<i>A. pickeli</i> , Vitória da Conquista, BA, BRA	0.130	0.137	0.156	0.059	0.060	0.000									
<i>A. pickeli</i> , Asuncion, PRY	0.088	0.094	0.107	0.011	0.043	0.054	0.000								
<i>A. pickeli</i> , Macapá, AP, BRA	0.090	0.093	0.106	0.013	0.045	0.056	0.001	0.000							
<i>A. montei</i> , Gandú, BA, BRA	0.076	0.071	0.062	0.091	0.130	0.139	0.088	0.086	0.000						
<i>A. montei</i> , Conchal, SP, BRA	0.072	0.065	0.063	0.090	0.134	0.139	0.090	0.088	0.017	0.000					
<i>A. n. sp. 2</i> , Janaúba, MG, BRA	0.079	0.082	0.096	0.030	0.065	0.068	0.024	0.026	0.079	0.077	0.000				
<i>A. manihoti</i> , Camamu, BA, BRA	0.112	0.119	0.127	0.093	0.119	0.125	0.082	0.083	0.115	0.117	0.077	0.000			
<i>A. manihoti</i> , Manaus, AM, BRA	0.129	0.135	0.144	0.107	0.134	0.137	0.098	0.099	0.132	0.132	0.093	0.033	0.000		
<i>A. serpentina</i> clone dna38	0.096	0.082	0.090	0.106	0.139	0.146	0.102	0.101	0.072	0.069	0.093	0.124	0.137	0.000	
<i>A. striata</i> clone dna41	0.069	0.068	0.079	0.098	0.132	0.137	0.094	0.093	0.071	0.072	0.085	0.122	0.139	0.069	0.000

A composição nucleotídica média das sequências do fragmento do gene COI (Tabela 4) mostra um desvio composicional de A+T = 67,8%, o que é esperado para o DNA região mitocondrial de insetos.

Tabela 4 - Composição nucleotídica média da matriz contendo as sequências da região do gene COI

Base	Frequência média(%)	Limite de variação (%)
A	32,2	29,8-33,4
T	35,6	34,2-37,0
G	14,4	13,7-15,4
C	17,7	15,6-19,2

A composição nucleotídica média da matriz contendo as sequências da região do gene COI, de acordo com a posição do códon está na Tabela 5.

Tabela 5 - Composição nucleotídica média da matriz contendo as sequências da região COI, de acordo com a posição do códon

Bases	Frequências médias (%)		
	Posições		
	1º	2º	3º
A	44,6	27,4	24,6
T	32,0	32,0	42
G	7,4	22,4	13,8
C	15,6	17,8	19,7

Os resultados obtidos com *Anastrepha* n. sp. 2 no sequenciamento COI, corroboram com os resultados obtidos nas análises morfométricas. A população dessa espécie apresenta-se em posição basal próximas às populações de *A. pickeli*, o que também pode ser verificado na análise da forma da asa e do tamanho do acúleo. Apesar de se apresentar bastante próxima geneticamente (0,024-0,068) das demais populações de *A. pickeli*, as diferenças significativas obtidas nas análises morfométricas indicam que *Anastrepha* n. sp. 2 constitui-se em novo táxon, diferenciando-se de *A.*

pickeli principalmente pelo tamanho do ápice do acúleo, conforme demonstrado por CANAL (1997), por meio da morfologia.

As populações das demais espécies do grupo estudadas neste trabalho, agruparam-se formando clados.

Vale ressaltar que não foi possível obter boas seqüências de *Anastrepha* n. sp. 3 para análise. Além disso, as amostras das espécies do grupo *spatulata* também foram submetidas ao sequenciamento de fragmentos do gene ITS e ND6, visando complementar os resultados obtidos com o COI. Infelizmente, devido à má qualidade da conservação das amostras, não foi possível obter seqüências de qualidade, bem como, sequenciar indivíduos de todas as regiões analisadas.

2.3.3 Análise morfométrica e molecular de *Anastrepha pickeli*

As populações de *A. pickeli* foram coletadas no Brasil (Bahia, Espírito Santo, Rio Grande do Norte e Amazonas) e também na Bolívia e Paraguai (Tabela 6). Os espécimes *voucher* foram depositados na coleção de insetos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba, SP, Brasil.

2.3.3.1 Morfometria tradicional

As variáveis L1 (comprimento o ápice do acúleo), L4 (largura do ápice do acúleo no final da abertura da cloaca) e L5 (comprimento da serra) mostraram diferenças significativas entre as populações analisadas por meio da morfometria tradicional (Wilk's Lambda, $P < 0,05$).

Tabela 6 - Dados de coleta e informações sobre as espécies de *Anastrepha*

Espécies	Dados de coleta	Locais de coleta	Localização	Altitudes (m)	Preservação	¹ N	² M	Códigos (morfometria)	³ S
<i>A. pickeli</i>									
	Armadilha McPhail	Teixeira de Freitas, BA, Brasil	18°06'S, 39°53'W	186	Etanol 100% (Freezer)	13	10	APBA	1
	Armadilha McPhail	Linhares, ES, Brasil	19°23'S, 40°04'W	33	Etanol 100% (Freezer)	10	10	APES	1
	Armadilha McPhail	Natal, RN, Brasil	05°47'S, 35°12' W	30	Etanol 100% (Freezer)	10	10	APRN	1
	Armadilha McPhail	Manaus, AM, Brasil	03°06'S, 60°01'W	92	Etanol 100% (Freezer)	10	10	APAM/APMA	1
	Armadilha McPhail	Cochabamba, Bolívia	17°38'S, 66°15'W	2574	Etanol 100% (Freezer)	15	10	APBO	1
	Armadilha McPhail	Asunción, Paraguai	25°26'S, 57°66'W	55	Etanol 100% (Freezer)	15	10	APPA	1
<i>A. serpentina</i>									
	Armadilha McPhail	Manaus, AM, Brasil	03°06'S, 60°01'W	92	Etanol 100% (Freezer)	02	00	-	1
<i>A. striata</i>									
	Armadilha McPhail	Manaus, AM, Brasil	03°06'S, 60°01'W	92	Etanol 100% (Freezer)	02	00	-	1

¹N - número de espécimes de cada localidade²M - número de espécimes analisados na morfometria³S - número de espécimes sequenciados

A análise de componentes principais, mostrou que essas três características morfométricas foram significativamente diferentes entre os pares de populações estudados; Amazonas e Espírito Santo, Bolívia e Rio Grande do Norte, Paraguai e Rio Grande do Norte (Wilk's Lambda, $P < 0,05$), enquanto as populações do Amazonas e Bolívia, Rio Grande do Norte e Espírito Santo não foram estatisticamente diferentes (Wilk's Lambda, $P > 0,05$). Em todos os caracteres analisados por morfometria tradicional, a população de *A. pickeli* da Bahia foi significativamente diferente das demais populações (Wilk's Lambda, $P < 0,0001$).

As variáveis L1, L4 e L5 explicaram 62,6% da variabilidade dos dados. A população da Bahia não agrupou com as demais populações, que formaram dois grupos, um com as populações do Paraguai, Rio Grande do Norte e Espírito Santo, e um segundo com as populações da Bolívia e Amazonas (Figura 24). A MANOVA dos dados morfométricos tradicionais indicaram que as populações não foram estatisticamente diferentes (Wilk's Lambda = 0,33, $P > 0,05$).

Figura 24 - Dendrograma da análise de agrupamento (UPGMA) das populações de *Anastrepha pickeli* do Amazonas (APAM), Bahia (APBA), Espírito Santo (APES), Rio Grande do Norte (APRN), Bolívia (APBO) e Paraguai (APPA)

2.3.3.2 Morfometria geométrica

2.3.3.2.2 Análise do tamanho do centróide

O tamanho médio do centróide variou entre 7,0 e 8,0. Os valores das médias e o desvio padrão estão representados graficamente na Figura 25. A análise do tamanho do centróide indicou que a população do Paraguai foi significativamente diferente das demais (Mann-Whitney, $P > 0,05$) e a população da Bolívia foi significativamente diferente da população do Rio Grande do Norte (Mann-Whitney, $P > 0,05$). A diferença significativa verificada para a população do Paraguai permite inferir que essa população apresenta asa maior quando comparada com as demais populações.

Figura 25 - Valores médios e desvio-padrão do tamanho do centróide das asas de fêmeas de *Anastrepha pickeli* do Amazonas (APAM), Bahia (APBA), Espírito Santo (APES), Rio Grande do Norte (APRN), Bolívia (APBO) e Paraguai (APPA)

2.3.3.2.2 Análise de deformações relativas

Um total de 24 deformações relativas foi gerado ($K = 2n - 4$), onde K representa o número de deformações relativas e n o número de *landmarks*. A MANOVA das variáveis canônicas das deformações relativas mostrou diferenças significativas entre as populações (Wilk's Lambda = 0.006; $P < 0,05$). Diferenças significativas foram

observadas entre as populações do Paraguai e do Espírito Santo (Wilk's Lambda, $P < 0,05$) e essas populações não foram significativamente diferentes das populações da Bahia e Rio Grande do Norte (Wilk's Lambda, $P > 0,05$), as quais apresentaram diferenças significativas entre si (Wilk's Lambda, $P < 0,05$). As populações de *A. pickeli* da Bolívia e do Amazonas foram facilmente distinguidas uma da outra e também de outras populações (Wilk's Lambda, $P < 0,05$). As duas primeiras variáveis canônicas explicaram 42,67% e 24,53% da variabilidade dos dados, respectivamente (Figura 26).

Figura 26 - Gráfico de dispersão de fêmeas de *Anastrepha pickeli* do Amazonas (APMA), Bahia (APBA), Espírito Santo (APES), Rio Grande do Norte (APRN), Bolívia (APBO) e Paraguai (APPA) no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2, geradas após a análise de coordenadas posicionais em plano cartesiano de 14 pontos anatômicos da asa. Os diagramas de deformações ao redor do gráfico indicam as conformações alares presumíveis para indivíduos situados no extremo superior e inferior das variáveis canônicas. As magnitudes das deformações foram aumentadas em 3X para visualização

A matriz de distância de Mahalanobis indicou a maior distância entre os pares de população da Bolívia e Bahia (35,93%), Amazonas e Rio Grande do Norte (30,94%), e Amazonas e Bahia (29,35%) (Tabela 7).

Tabela 7 - Distâncias de Mahalanobis de populações de *Anastrepha pickeli* do Amazonas (APMA), Bahia (APBA), Espírito Santo (APES), Rio Grande do Norte (APRN), Bolívia (APBO) e Paraguai (APPA) pelos componentes da forma das asas

	APBA	APES	APRN	APMA	APBO	APPA
APBA	0.00					
APES	9.49	0.00				
APRN	21.40	13.77	0.00			
APMA	29.35	26.05	30.64	0.00		
APBO	35.93	23.13	22.17	18.63	0.00	
APPA	14.37	17.75	15.93	26.48	25.17	0.00

A MANOVA indicou que as diferenças entre as populações não foram estatisticamente significativas com base na morfometria tradicional, ao contrário das diferenças significativas observadas na morfometria geométrica. *A. pickeli* é uma espécie especialista, dessa forma, deveria apresentar características morfológicas mais uniformes entre suas populações. Entretanto, essas diferenças podem ser atribuídas aos fatores bióticos (planta hospedeira) e aos abióticos (temperatura, precipitação pluvial, umidade relativa etc.). Por exemplo, para cinco espécies do grupo *fraterculus*, as medidas do acúleo (total e do ápice) variam ao longo da distribuição geográfica e também entre os exemplares obtidos em um mesmo hospedeiro (ARAÚJO & ZUCCHI, 2006). Alencar-Souza (1998) analisou o acúleo de duas espécies generalistas – *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) e *Anastrepha zenildae* Zucchi – e uma especialista – *A. pickeli* –, coletadas no Rio Grande do Norte e encontrou diferenças intraespecíficas nas populações de *A. pickeli* e atribuiu o fato a existência de duas espécies. É provável que na amostra estudada por Alencar-Souza (1998), além de exemplares de *A. pickeli*, havia também exemplares de uma espécie que ainda não foi formalmente descrita, que tem sido denominada *Anastrepha* sp. aff. *pickeli* (ARAÚJO et al. 2005).

No presente estudo, as amostras foram coletadas em várias regiões geográficas (Tabela 6), fato que pode explicar as diferenças entre as populações de *A. pickeli*. De acordo com alguns pesquisadores, as diferenças morfométricas relacionadas com o tamanho das estruturas, entre as populações analisadas, são duvidosas (ROHLF; MARCUS, 1993; ADAMS et al., 2004). Entretanto, a diferença significativa no tamanho da asa entre as populações da Bolívia e do Paraguai geradas, pela análise do tamanho do centróide, minimiza a influência de alguns fatores externos, pois essa medida representa o centro geométrico da asa, bem como o centro de massa de uma configuração, primordiais para a definição de tamanho (MONTEIRO; REIS, 1999). Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com o tamanho do centróide relatado por Nascimento (2005), que analisou uma população de laboratório de *A. pickeli* e também populações de espécies generalistas de *Anastrepha*. Entretanto, como a procedência da colônia de laboratório não foi informada, não foi possível a comparação dos dados obtidos por aquele autor com os deste estudo.

Os resultados da análise de variáveis canônicas revelaram que as populações de *A. pickeli* tendem a formar grupos, entretanto, a maioria mostra total ou parcial sobreposição. As populações do Amazonas e da Bolívia mostraram tendência a se localizar nos extremos superior da VC 1 e VC 2, respectivamente, ao contrário das populações do Rio Grande do Norte e Espírito Santo (Figura 26). As amostras de *A. pickeli* analisadas por Nascimento (2005) apresentaram asas alargadas na base e estreitas no ápice, distribuindo-se ao longo do eixo entre os dois extremos, quando comparada às espécies generalistas em diferentes grupos infragênicos. Pelo diagrama de deformações, deste trabalho, as populações do Amazonas e da Bolívia divergiram das demais populações, apresentando diferenças principalmente no *landmark* 4 (intersecção da nervura R_{4+5} com a costal), com tendência de estreitamento nessa região e o *landmark* 6 (intersecção da nervura CuA_1 com a margem da asa), com alargamento da base da asa nessas duas populações (Figura 26).

2.3.3.3 Análise molecular

2.3.3.3.1 Análise de máxima parcimônia

As sequências alinhadas, incluindo o grupo externo, resultaram em uma matriz de dados contendo 780 caracteres. Desses, 418 foram variáveis e 329 sítios foram informativos para parcimônia. Foram obtidas três árvores mais parcimoniosas na análise MP dos dados de COI e a árvore de consenso estrito é mostrada na Figura 27. O alinhamento das sequências está no anexo.

Figura 27 - Relações entre as populações de *Anastrepha pickeli* na árvore de consenso estrito pelo método da máxima parcimônia. Os números nos ramos representam os valores de *bootstrap* encontrados a partir de 1.000 replicações. A figura contém somente os valores de *bootstrap* acima de 50%. Comprimento da árvore: 412 passos, índice de consistência (C.I.) de 0.97 e índice de retenção (R.I) de 0.96

2.3.3.3.2 Análise de *neighbor-joining*

A topologia da árvore de *neighbor-joining* é muito similar no posicionamento das populações na árvore de consenso de MP (Figura 28).

Este é o mais extensivo estudo molecular com populações de *A. pickeli*, tanto em número de amostras como de localidades, ainda assim não foi possível obter espécimes representando toda a área de ocorrência dessa espécie, inclusive no Brasil. As populações de *A. pickeli* foram recuperadas como um grupo monofilético com grande suporte na árvore de NJ. Os dados de COI indicaram a existência de três grupos de populações com suporte razoável, o primeiro grupo incluiu as populações do Amazonas, Bolívia e Rio Grande do Norte, o segundo, as populações da Bahia e Espírito Santo e o terceiro, somente a população do Paraguai, que é um clado fortemente sustentado e altamente divergente na base da árvore das populações de *A. pickeli*. Curiosamente, a topologia das duas árvores de MP e NJ reflete a proximidade geográfica entre as amostras do norte para o sul. Isto é consistente com o fato de que o norte da Amazônia é considerado o local de domesticação da mandioca (Nassar, 1978), que é o principal hospedeiro de *A. pickeli* em toda a sua distribuição geográfica.

A distância média entre as populações de *A. pickeli* foi 0.057 ± 0.049 . O nível de divergência nas sequências variou de um mínimo de 0,003 para um máximo de distância de 0,127 entre as populações. A menor distância (0,003) foi entre as populações do Amazonas e Rio Grande do Norte e a maior divergência (0,127) foi verificada entre as populações do Paraguai e Bahia (Tabela 8).

Figura 28 - Relações entre as populações de *Anastrepha pickeli* na árvore de consenso estrito pelo método de *neighbor-joining* com a distância Jukes-Cantor. Os números nos ramos representam os valores de *bootstrap* encontrados a partir de 1.000 replicações. A figura contém somente os valores de *bootstrap* acima de 50%. Comprimento da árvore: 412 passos, índice de consistência (C.I.) de 0.97 e índice de retenção (R.I) de 0.96

Os resultados mostraram um alto nível de variação genética entre as populações de *A. pickeli* coletadas em várias regiões geográficas. Há forte divergência molecular (JC = distância 0,113 – 0,127) entre a amostra do Paraguai, nos extremos da distribuição e as demais populações. Estudos adicionais, incluindo amostragens em toda a distribuição de *A. pickeli*, são necessários para explorar os limites da espécie, uma vez que estudos recentes revelaram que espécies com ampla distribuição são realmente complexos críptico de espécies, como no complexo de *A. fraterculus* (ver NORRBOM et al., 1999).

Os estudos moleculares filogenéticos anteriores, utilizando sequências do gene 16S rRNA (MCPHERON et al., 1999) e do gene *period* (BARRA et al., 2005), com *A. pickeli* da Bahia, mostrou que essa espécie agrupou com *A. alveata*, *A. manihoti* e *A. montei* (espécies do grupo *spatulata*).

Tabela 8 - Matriz de distância genética entre as sequências da região COI das populações de *Anastrepha pickeli*

	<i>A. pickeli</i> , Manaus, AM, BRA	<i>A. pickeli</i> , Natal, RN, BRA	<i>A. pickeli</i> , Cochabamba, BOL	<i>A. pickeli</i> , Linhares, ES, BRA	<i>A. pickeli</i> , Teixeira Freitas, BA, BRA	<i>A. pickeli</i> , Asunción, PRY	<i>A. striata</i> , Manaus, AM, BRA	<i>A. serpentina</i> , Manaus, AM, BRA
<i>A. pickeli</i> , Manaus, AM, BRA	0.000							
<i>A. pickeli</i> , Natal, RN, BRA	0.003	0.000						
<i>A. pickeli</i> , Cochabamba, BOL	0.016	0.016	0.000					
<i>A. pickeli</i> , Linhares, ES, BRA	0.021	0.018	0.034	0.000				
<i>A. pickeli</i> , Teixeira de Freitas, BA, BRA	0.034	0.031	0.048	0.013	0.000			
<i>A. pickeli</i> , Asunción, PRY	0.113	0.113	0.125	0.123	0.127	0.000		
<i>A. striata</i> , Manaus, AM, BRA	0.841	0.841	0.851	0.841	0.826	0.892	0.000	
<i>A. serpentina</i> , Manaus, AM, BRA	0.892	0.892	0.902	0.892	0.876	0.946	0.031	0.000

A composição nucleotídica média das sequências do fragmento do gene COI (Tabela 9) mostra um desvio composicional de A+T = 62,4%, esperado para a região mitocondrial de insetos. A composição nucleotídica média da matriz contendo as sequências da região do gene COI, de acordo com a posição do códon encontra-se na Tabela 10.

Tabela 9 - Composição nucleotídica média da matriz contendo as sequências da região do gene COI

Bases	Frequências médias(%)	Limites de variação (%)
A	31,3	25,6-36,1
T	31,1	28,2-33,7
G	18,4	15,5-21,9
C	19,1	16,6-24,3

Tabela 10 - Composição nucleotídica média da matriz contendo as sequências da região COI, de acordo com a posição do códon

Bases	Frequências média(%)		
	Posições		
	1º	2º	3º
A	28,6	33,0	32,5
T	34,0	28,0	31,0
G	17,8	17,5	20,0
C	19,4	21,3	16,7

A caracterização morfométrica tradicional e geométrica favoreceu a formação de clados para as populações de *A. pickeli* e a variação nas sequências da COI foi satisfatória na distinção delas. As populações do Amazonas e Bolívia apresentaram maior divergência genética e morfológica, quando comparada com as populações do Rio Grande do Norte, Bahia e Espírito Santo. Entretanto, há necessidade de amostras com maior amplitude geográfica, associadas com informações precisas de coleta (hospedeiros, parâmetros climáticos, biomas etc.), para melhor esclarecimento das relações entre as populações, não somente de *A. pickeli* como também para as demais espécies do grupo *spatulata*.

3 CONCLUSÕES

A análise de tamanho, efetuada por meio da morfometria tradicional, revelou que as variáveis; comprimento do ápice do acúleo, largura do acúleo na abertura da cloaca e comprimento da serra apresentaram diferenças significativas para a distinção entre as populações de espécies do grupo *spatulata*;

A deformação alar foi verificada nas intersecções da nervura R_{4+5} com a costal, da nervura M com a margem da asa, da nervura CuA_2 com a margem da asa e da nervura Cu_1 com a M;

A variação nas sequências da COI foi satisfatória na distinção entre as espécies do grupo;

Houve diferenças intraespecíficas nas populações de *A. pickeli*;

Com base nas análises morfométrica e molecular confirmou-se que *Anastrepha* n. sp. 2 é uma nova espécie do grupo *spatulata*;

Com base nas análises morfométricas confirmou-se que *Anastrepha* n. sp. 3 é uma nova espécie do grupo *spatulata*;

Houve diferenças intraespecíficas nas populações de espécies do grupo *spatulata*.

REFERÊNCIAS

- 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. 79p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- ADAMS, D.C.; ROHLF, F.J.; SLICE, D.E. Geometric morphometrics: ten years of progress following the "revolution". **Italian Journal of Zoology**, London v.71, p. 5-16, 2004.
- 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.
- AÑES, N.; VALENTA, D.T.; CAZORLA, D.; QUICKE, D.J.; FELICIANGELI, M.D. Multivariate analysis to discriminate species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) *Lutzomyia townsendi*, *L. spinicrassa*, and *L. youngi*. **Journal of Medical Entomology**, Entomological Society of America, Lanham, v. 34, n.3, p. 312-316, May. 1997.
- ARAUJO, E.L.; ZUCCHI, R.A. Medidas do acúleo na caracterização de cinco espécies de *Anastrepha* do grupo *fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 3, p. 1-9, Maio-Jun. 2006.
- ARAUJO, E.L.; MEDEIROS, M.K. M.; SILVA, V.E.; ZUCCHI, R.A. Moscas-das-Frutas (Diptera: Tephritidae) no Semi-Árido do Rio Grande do Norte: Plantas Hospedeiras e Índices de Infestação. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 889-894, Nov-Dez. 2005.
- ASTÚA, D. Morfometria geométrica e a revolução morfométrica - Localizando e visualizando mudanças na forma dos organismos. **Bioletim - Revista de Divulgação Científica dos Estudantes de Biologia**, São Paulo, v. 3, p. 20, 2003.
- AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history, and evolution**. 2nd ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 684p. 1994.
- BARR, N.B.; LIWANG, C.; MCPHERON, B.A. Molecular systematics of nuclear *period* in genus *Anastrepha* (Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 98, p. 173-180, 2005.
- BEHURA, S.K. Molecular marks systems in insects: current trends and future avenues. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, n. 11, p. 3087-3113, 2006.

BLACKITH, R.E.; REYMENT, R.A. **Multivariate morphometrics**. London: Academic Press, 1971. 1v.

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

BOYKIN, L.M.; SHATTERS, R.G.; HALL, D.G.; BURNS, R.E.; FRANQUI, R.A. Analysis of host preference and geographical distribution of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) using phylogenetic analyses of mitochondrial cytochrome oxidase I DNA sequence data. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 96, n. 5, p. 457-469, 2006.

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

CAVALCANTI, M.J.; LOPES, P.R.D. Análise morfométrica multivariada de cinco espécies de serranidae (Teleostei: Perciformes). **Acta Biologica Leopoldensia**, São Leopoldo, v. 15, n. 1, p. 53-64, 1993.

DALY, H.V. Insect morphometric. **Annual Review of Entomology**, Standfort, v. 30, p. 415-438, 1985.

FOOTE, R.H.; BLANC, F.L.; NORRBOM, A.L. **Handbook of the fruit flies (Diptera: Tephritidae) of America North of Mexico**. Ithaca: Comstock Publishing Associates, 1993. 571 p.

GASPARICH, G.E.; SHEPPARD, W.S.; HAN, H.Y.; MCPHERON, B.A.; STECK, G.J. Analysis of mitochondrial DNA and development of PCR-based diagnostic molecular markers for Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) populations. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 61–67, 1995.

GRANER, E.A. Notas sobre florescimento e frutificação da mandioca. Boletim Técnico da Divisão de Experimentação e Pesquisas. Instituto Agrônomo. **Bragantia**, Campinas, v. 2, n. 1, p. 1-12, 1942.

HALL, T.A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAN, H.-Y.; MCPHERON, B.A. Molecular phylogenetic study of Tephritidae (Insecta: Diptera) using partial sequences of the mitochondrial 16S ribosomal DNA. **Molecular Phylogenic and Evolution**, Orlando, v. 7, n. 1, p. 17-32, 1997.

HENSLEIGH, D.A.; ATCHLEY, W.R. Morphometric variability in natural and laboratory populations of *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). **Journal Medical Entomology**, Honolulu, v. 14, n.3, p. 379-386, 1997.

HERNÁNDEZ-ORTIZ, V. Lista preliminar de espécies mexicanas del género *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) con descripción de nuevas espécies, registros e sinonímias. **Folia Entomológica Mexicana**, México, v. 80, p. 227-244, 1990.

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

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

HRIBAR, L.J. Geographic variation of male genitalia of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). **Mosquito Systematics**, Raleigh, v. 26, n. 3, p. 132-144, 1994.

IMASHEVA, A.G.; BUBLI, O.A.; LAZEBNY, O.E.; ZHIVOTOVSKY, L.A. Geographic differentiation in wing shape in *Drosophila melanogaster*. **Genetica**, Dordrecht, v.96, p.303-306, 1995.

JAMES, F.C.; MCCULLOCH, C.E. Multivariate analysis in ecology and systematics: panacea or pandora's Box? **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 21, p. 129-166, 1990.

JESUS, W.S. de; MORAES, C.F.; TELES, F.F.; SEDIYAMA, C.S. Teor de ácido cianídrico nas folhas e raízes de dez variedades de mandioca *Manihot esculenta* Crantz, durante o primeiro ciclo. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v. 5, p. 83-90, 1986.

LI, W-H. **Molecular evolution**. Sunderland, MA: Sinauer, 1997. 487p.

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

LOZANO, J.C.; BELLOTI, A.; REYS, J.A.; HOWELER, R.; LEIHNER, D.; DOLL, J. **Problemas em el cultivo de la yuca**. Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT. Traduzido por SILVA, J.R. EMBRATER, Serviço de extensão rural. Brasília, :Ministério da Agricultura - Brasil. 1983. 208 p.

MARTINS, D.S.; URAMOTO, K.; LANI, M.C.R. Diversidade de moscas-das-frutas nas áreas monitoradas no norte do Espírito Santo do programa de exportação do mamão brasileiro para os Estados Unidos. In: MARTINS, D.S. (Ed.). **Papaya Brasil: mercado e inovações tecnológicas para o mamão**. Incaper, Vitória, v. 15, p. 493-497, 2005.

MCNAMEE, S.; DYTHAM, C. Morphometric discrimination of the sibling species *Drosophila melanogaster* (Meigen) and *D. simulans* (Sturtevant) (Diptera: Drosophilidae). **Systematic Entomology**, Oxford, v. 18, p. 231-236, 1993.

MCPHERON, 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. chap. 3: p.343-361.

MCPHERON, B.A. Population genetics and cryptic species. In: TAN, K.H. (Ed.). **Area-wide control of fruit flies and other insect pests**. Penang: Penerbit Universiti Sains Malaysia, 2000. p. 483-490.

MENDONÇA, C.; REIS, S.F. Multivariate morphometric analysis of selected *Proisotoma* species (Collembola: Isotomidae). **Zoologische Anzeiger**, Jena, v. 227, n. 1, p. 98-103, 1991.

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

MONTEIRO, L.R.; BORDIN, B.; REIS, S.F. dos. Shape distances, shape spaces and the comparison of morphometric methods. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v. 15, n. 6, p. 210-220, June, 2000.

MONTEIRO, L.R.; DINIZ-FILHO, J.A.F.; REIS, S. F. dos; ARAÚJO, E.D. Shape distances in general linear models: Are they really at odds with the goals of morphometrics? A reply to klingenberg. **Evolution**, Lancaster, v. 57, n. 1, p. 196 - 199, 2003.

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

MORGANTE, J.S.; SELIVON, D.; SOLFERINI, V.N.; NASCIMENTO, A.S. do. Genetic and morphological differentiation in the specialist species *Anastrepha pickeli* and *A. monteí*. In: STECK, G.J.; MCPHERON, B.A. (Ed.). **Fruit fly pest: a world assessment of their biology and management**. Delray Beach, FL.:St. Luss.Press, 1996. p. 273-276.

NASCIMENTO, A.S.; ZUCCHI, R.A. Dinâmica populacional das moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* (Dip., Tephritidae) no recôncavo baiano. I. Levantamento das species. **Revista Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 16, p. 763-767, 1981.

NASCIMENTO, A.S.; MORGANTE, J.S.; MALAVASI, A.; URAMOTO, K. Occurrence and distribution of *Anastrepha* in melon production areas in Brazil, In: MARTIN, A.; LIEDO, P. (Eds.). **Fruit flies: biology and management**. New York:Springer-Verlag, 1993. p. 39-42.

NASCIMENTO, F.M. do. **Análises morfométricas em duas espécies do complexo *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) e inferências genéticas a partir do cruzamento interespecífico**. 2000. 98p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Evolutiva) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

NASCIMENTO, F.M. do. **Morfometria geométrica aplicada ao estudo de variações alares em espécies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae)**. 2005. 84p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Evolutiva) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

NASSAR, N.M.A. Wild *Manihot* species of central Brazil for cassava breeding. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 58, p. 257-261, 1978.

NORRBOM, A.L.; KIM, K.C. **A list of the reported host plants of the species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae)**. U. S. Dept. Agric. APHIS-PPQ, 1988. p. 52-81, 114p.

NORRBOM, A.L.; ZUCCHI, R.A.; HERNÁNDEZ-HORTIZ, V. Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxtrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based on morphology, In: ALUJA M.; NORRBOM A. L. (Ed.). **Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior**. Boca Raton: CRC Press, v. 16, 1999. chap. 12, p. 299-342.

NORRBOM, A. L.; KORYTKOWSKI, C. A. **A revision of the *Anastrepha robusta* species group (Diptera: Tephritidae)**. Auckland: Magnolia Press. Zootaxa, 2182: 1-91. 2009.

NORRBOM, A. L.; KORYTKOWSKI, C. A. **New species of and taxonomic notes on *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae)**. Auckland: Magnolia Press. Zootaxa, 2740: 1-23. 2011.

PIMENTEL, R.A. **Morphometrics, the multivariate analysis of biological data**. Kendal/Hunt Publishing, 1979. 276 p.

PRIMROSE, S.B. **Princípios de análise do genoma**. 2nd.ed. Ribeirão Preto: Editora FUNPEC, 2003. 193 p.

REIS, S.F. Morfometria e estatística multivariada em biologia evolutiva. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 5, n. 4, p. 571-580, 1988.

REYMENT, R.A.; BLACKITH, R.E.; CAMPBELL, N.A. **Multivariate morphometrics**. London: Academic 1984. 233p.

ROCHA, L.S. **Caracterização de populações de *Anastrepha sororcula* Zucchi, 1979 (Diptera: Tephritidae) por análises cromossômicas, morfométricas e moleculares**. 2005. 127p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Evolutiva) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

RHOLF, F.J.; MARCUS, L.F. A revolution in morphometrics. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v. 8, p. 129-132, 1993.

ROHLF, F.J. **Program tpsUtil, version 1.44**. Departament of Ecology and Evolution. Stony brook: State University of New York. Disponível em: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>. Acesso em: 15 Ago. 2009a.

ROHLF, F.J. **Program tpsDig, version 2.12**. Stony brook: State University of New York, Departament of Ecology and Evolution. Disponível em: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>. Acesso em: 15 Ago. 2009b.

ROHLF, F.J. **Program tpsRwl, version 1.46**. Stony brook: State University of New York, Departament of Ecology and Evolution. Disponível em: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>. Acesso em: 15 Ago. 2009c.

ROHLF, F.J. **Program tpsRegr version 1.37**. Stony brook: State University of New York, Departament of Ecology and Evolution. Disponível em: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>. Acesso em: 15 Ago. 2009d.

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

SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética - Um guia prático**. 3.ed. Holos, editora e Sociedade Brasileira de genética, 2007. 90p.

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

SELIVON, D.; PERODINI, A.L.P.; MORGANTE, J.S. A Genetic–Morphological characterization of two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* Complex (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 98, n. 3, p. 367-381, 2005.

SHAW, J.G. Species of the *spatulata* group of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) **Journal Kansas Entomological Society**, Manhattan, v. 35, p. 408-414, 1962.

SILVA, J.G. Estudos moleculares. In: MALAVASI, A, ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2000. cap. 3: p.29-39.

SILVA J G.; BARR N.B. Recent advances in molecular systematics of *Anastrepha* Schiner. In: SUGAYAMA, R.L.; ZUCCHI, R.A.; OVRUSKI, S.; SIVINSKI, J. (Org.). INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FRUIT FLIES OF ECONOMIC IMPORTANCE, 7., 2008. Salvador. **Proceedings...** Salvador: Press Color, 2008. p. 13-18.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction *primers*. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 87, p. 651-701, 1994.

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

SOLÉ-CAVA, A.M. Biodiversidade molecular e genética da conservação In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2004. cap. 17: p.172-192.

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

SPERLING, F. A. H.; HICKEY, D. A. Mitochondrial DNA sequence variation in the Spruce Budworm species complex (*Choristoneura*: Lepidoptera). **Molecular Biology Evolution**, Chicago, v. 11, p. 656-665, 1994.

STAT SOFT. **Statistica for windows**: versão 9.0. Tulsa, 2010.

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

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, 2008.

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

THORPE, R.S. Biometric analysis of geographic variation and racial affinities. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 51, p. 407-452, 1976.

UCHÔA F.: M.A.; OLIVEIRA, I.; MOLINA, R.M. da S.; ZUCCHI, R.A. Constatação de *Anastrepha alveatoides*, *A. castanea* e de *A. haywardi* (Diptera, Tephritidae) no Brasil, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 17, 1998. Rio de Janeiro.

Resumos... SEB: Rio de Janeiro, RJ. 1998. p. 72.

URAMOTO K.; MARTINS, D.S.; LIMA, R.A.; ZUCCHI, R.A. Host plant record for the fruit flies, *Anastrepha fumipennis* and *A. nascimentoi* (Diptera, Tephritidae). **Journal of Insect Science**, Madison, v. 8, n.45, p. 1-4, 2008.

ZUCCHI, R.A. Lista das espécies de *Anastrepha*, sinônímias, plantas hospedeiras e parasitóides. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**. Conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, Editora, 2000a. cap. 4, p. 41-48.

ZUCCHI, R.A. Taxonomia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**. Conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, Editora, 2000b. cap. 1, p.13-24.

ZUCCHI, R.A. 2008. **Fruit flies in Brazil – *Anastrepha* species their host plants and parasitoids**. Disponível em WWW: lea.esalq.usp.br/anastrepha/. Acesso em: 11 Fev. 2011.

ANEXOS

Alinhamento das sequências da região COI para o estudo das relações filogenéticas de espécies de *Anastrepha* do grupo *spatulata* por meio do sequenciamento do fragmento do DNA mitocondrial que codifica para a subunidade I da citocromo oxidase (COI)

A. *alveata*, Vera Cruz/MEX
 A. *alveata*, St. Vit. /BA/BRA
 A. *spatulata*, Vera Cruz/MEX
 A. *pickeli*, Manaus/AM/BRA
 A. *pickeli*, Natal/RN/BRA
 A. *pickeli*, Vit. Conq. /BA/BRA
 A. *pickeli*, Asuncion/PRY
 A. *pickeli*, Macapá/AP/BRA
 A. *montei*, Gandú/BA/BRA
 A. *montei*, Conchal/SP/BRA
 A. n. sp. 2, Janaúba/MG/BRA
 A. *manihoti*, Camamu/BA/BRA
 A. *manihoti*, Manaus/AM/BRA
 A. *serpentina* clone dna38
 A. *striata* clone dna41

A. *alveata*, Vera Cruz/MEX
 A. *alveata*, St. Vit. /BA/BRA
 A. *spatulata*, Vera Cruz/MEX
 A. *pickeli*, Manaus/AM/BRA
 A. *pickeli*, Natal/RN/BRA
 A. *pickeli*, Vit. Conq. /BA/BRA
 A. *pickeli*, Asuncion/PRY
 A. *pickeli*, Macapá/AP/BRA
 A. *montei*, Gandú/BA/BRA
 A. *montei*, Conchal/SP/BRA
 A. n. sp. 2, Janaúba/MG/BRA
 A. *manihoti*, Camamu/BA/BRA
 A. *manihoti*, Manaus/AM/BRA
 A. *serpentina* clone dna38
 A. *striata* clone dna41

A. *alveata*, Vera Cruz/MEX
 A. *alveata*, St. Vit. /BA/BRA
 A. *spatulata*, Vera Cruz/MEX
 A. *pickeli*, Manaus/AM/BRA
 A. *pickeli*, Natal/RN/BRA
 A. *pickeli*, Vit. Conq. /BA/BRA
 A. *pickeli*, Asuncion/PRY
 A. *pickeli*, Macapá/AP/BRA
 A. *montei*, Gandú/BA/BRA
 A. *montei*, Conchal/SP/BRA
 A. n. sp. 2, Janaúba/MG/BRA
 A. *manihoti*, Camamu/BA/BRA
 A. *manihoti*, Manaus/AM/BRA
 A. *serpentina* clone dna38
 A. *striata* clone dna41

A. pickeli, Macapá/AP/BRA
A. montei, Gandú/BA/BRA
A. montei, Conchal/SP/BRA
A. n. sp. 2, Janaúba/MG/BRA
A. manihoti, Camamu/BA/BRA
A. manihoti, Manaus/AM/BRA
A. serpentina clone dna38
A. striata clone dna41

A. alveata, Vera Cruz/MEX
A. alveata, St. Vit./BA/BRA
A. spatulata, Vera Cruz/MEX
A. pickeli, Manaus/AM/BRA
A. pickeli, Natal/RN/BRA
A. pickeli, Vit. Conq./BA/BRA
A. pickeli, Asunción/PRY
A. pickeli, Macapá/AP/BRA
A. montei, Gandú/BA/BRA
A. montei, Conchal/SP/BRA
A. n. sp. 2, Janaúba/MG/BRA
A. manihoti, Camamu/BA/BRA
A. manihoti, Manaus/AM/BRA
A. serpentina clone dna38
A. striata clone dna41

A. alveata, Vera Cruz/MEX
A. alveata, St. Vit./BA/BRA
A. spatulata, Vera Cruz/MEX
A. pickeli, Manaus/AM/BRA
A. pickeli, Natal/RN/BRA
A. pickeli, Vit. Conq./BA/BRA
A. pickeli, Asunción/PRY
A. pickeli, Macapá/AP/BRA
A. montei, Gandú/BA/BRA
A. montei, Conchal/SP/BRA
A. n. sp. 2, Janaúba/MG/BRA
A. manihoti, Camamu/BA/BRA
A. manihoti, Manaus/AM/BRA
A. serpentina clone dna38
A. striata clone dna41

A. alveata, Vera Cruz/MEX
A. alveata, St. Vit./BA/BRA
A. spatulata, Vera Cruz/MEX
A. pickeli, Manaus/AM/BRA

CACTTTCATGGAAACCCAATTAAATTATTTACCAGCAATATTATGAGCTCTAGGATTGTTTTTTTTTTTACAGTAGGAGGATTAACCGGAGTAATACTTGC
CACTTTCATGGAACTCAATTAAATTATTTACCAGCAATAATATGGGCTTTAGGATTGTTTTTTTTTTTACAGTAGGTGGATTAACTGGAGTAATACTTGC
CACTTTCATGGAACTCAATTAAATTACTACCAGCAATACTATGAGCTTTAGGATTGTTTTTTTTTTTACAGTAGGAGGATTAACCGGAGTAATACTTGC
CACTTTCATGGAACTCAATTAAATTATTTACCAGCAATAATATGAGCTCTAGGATTGTTTTTTTTTTTACAGTAGGAGGATTAACTGGAGTAATACTTGC
CACTCCACGGAAACCCAATTAAATTATTTACCAGCAATAATATGAGCTCTAGGCTTTGTTTTTTTTTTTACAGTTGGAGGATTGACCGGAGTAATACTTGC
CACTCCACGGAACTCAATTAAATTATTTACCAGCAATAATATGAGCTCTAGGCTTTGTTTTTTTTTTTACAGTTGGAGGATTGACCGGAGTAATACTTGC
CACTTTCATGGAACTCAATTAAATTACTCCCAGCAATACTATGAGCTTTAGGATTGTTATTCTTATTACAGTTGGAGGATTAACCGGAGTAATACTTGC
CACTACATGGAACTCACTAAATTATTTCCCAGCAATAATATGAGCTCTAGGATTGTTTTCTTATTACAGTAGGAGGATTAACAGGAGTAATACTTGC

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
....|
TAATTCATCTGTAGATATTATTTTACACGACACTTATTATGTTGTAGCTCATTTCCTACTATGTATTATCTATAGGAGCAGTATTTCGCAATTATAGCTGGA
TAATTCATCTGTAGATATTATTTTACACGACACTTACTATGTTGTAGCTCATTTCCTACTATGTATTATCTATAGGAGCAGTATTTCGCAATTATAGCTGGA
CAATTCATCTGTAGATATTATCTTACATGATACTTATTATGTTGTAGCTCATTTCCTACTATGTATTATCTATAGGAGCAGTATTTCGCAATTATAGCTGGA
TAATTCATCTGTAGATATCATTTCATGACACTTATTATGTTGTAGCTCATTTCCTACTATGTATTATCTATAGGAGCAGTATTTCGCTATCATAGCTGGA
TAATTCATCTGTAGATATCATTTCATGACACTTATTATGTTGTAGCTCATTTCCTACTATGTATTATCTATAGGAGCAGTATTTCGCTATCATAGCTGGA
TAATTCATCTGTAGATATCATTTCATGACACTTATTATGTTGTAGCTCATTTCCTACTATGTATTATCTATAGGAGCAGTATTTCGCTATCATAGCTGGA
TAATTCATCTGTAGATATCATTTCATGACACTTATTATGTTGTAGCTCATTTCCTACTATGTATTATCTATAGGAGCAGTATTTCGCTATCATAGCTGGA
TAATTCATCTGTAGATATCATTTCATGACACTTATTATGTTGTAGCTCATTTCCTACTATGTATTATCTATAGGAGCAGTATTTCGCTATCATAGCTGGA
CAATTCATCTGTAGATATCATTCTACATGATACCTACTATGTTGTAGCTCATTTCCTACTATGTATTATCTATAGGAGCAGTATTTCGCAATTATAGCTGGA
CAATTCATCTGTAGATATCATTCTACATGATACCTACTATGTTGTAGCTCATTTCCTACTATGTATTATCTATAGGAGCAGTATTTCGCAATTATAGCTGGA
TAATTCATCTGTAGATATTATTTTACATGACACTTACTATGTTGTAGCTCATTTCCTACTATGTATTATCTATAGGAGCAGTATTTCGCTATCATAGCTGGA
TAATTCATCTGTAGATATTATTTTACATGACACTTACTATGTTGTAGCTCATTTCCTACTATGTATTATCTATAGGAGCAGTATTTCGCTATCATAGCTGGA
TAATTCATCTGTAGATATCATTTCATGACACTTATTATGTTGTAGCTCATTTCCTACTATGTATTATCTATAGGAGCAGTATTTCGCTATCATAGCTGGA
TAATTCATCTGTAGATATTATTTTACATGATACTTACTATGTTGTAGCTCATTTCCTACTATGTATTATCTATAGGAGCAGTATTTCGCTATCATAGCTGGA
TAATTCATCTGTAGATATTATTTTACATGACACTTATTATGTTGTAGCTCATTTCCTACTATGTATTATCTATAGGAGCAGTATTTCGCTATCATAGCTGGA
TAATTCATCTGTAGATATTATTTTACATGACACTTATTATGTTGTAGCTCATTTCCTACTATGTATTATCTATAGGAGCAGTATTTCGCTATCATAGCTGGA

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
....|
TTTATTCACCTGATACCCCTTACTTACTGGACTAAATATAAACCCCTAGATGATTAAAAAGTCAATTATTATTATTTATTGGAGTAAATTTAACATTCT
TTTATTCACCTGATACCCCTTACTTACTGGACTAAATATAAACCCCTAGATGATTAAAAAGTCAATTATTATTATTTATTGGAGTAAATTTAACATTCT
TTTATTCACCTGATACCCCTTACTTACCAGGATTAATATAAACCCCTAGATGATTAAAAAGTCAATTATTATTATTTATTGGAGTAAATTTAACATTCT
TTTATTCACCTGATACCCCTTACTTACCAGGATTAATATAAACCCCTAGATGATTAAAAAGTCAATTATTATTATTTATTGGAGTAAATTTAACATTCT
TTTATTCACCTGATACCCCTTACTTACCAGGATTAATATAAACCCCTAGATGATTAAAAAGTCAATTATTATTATTTATTGGAGTAAATTTAACATTCT
TTTATTCACCTGATACCCCTTACTTACCAGGATTAATATAAACCCCTAGATGATTAAAAAGTCAATTATTATTATTTATTGGAGTAAATTTAACATTCT
TTTATTCACCTGATACCCCTTACTTACCAGGATTAATATAAACCCCTAGATGATTAAAAAGTCAATTATTATTATTTATTGGAGTAAATTTAACATTCT
TTTATTCACCTGATACCCCTTACTTACCAGGATTAATATAAACCCCTAGATGATTAAAAAGTCAATTATTATTATTTATTGGAGTAAATTTAACATTCT
TTTATTCACCTGATACCCCTTACTTACCAGGATTAATATAAACCCCTAGATGATTAAAAAGTCAATTATTATTATTTATTGGAGTAAATTTAACATTCT
TTTATTCACCTGATACCCCTTACTTACCAGGATTAATATAAACCCCTAGATGATTAAAAAGTCAATTATTATTATTTATTGGAGTAAATTTAACATTCT
TTTATTCACCTGATACCCCTTACTTACCAGGATTAATATAAACCCCTAGATGATTAAAAAGTCAATTATTATTATTTATTGGAGTAAATTTAACATTCT
TTTATTCACCTGATACCCCTTACTTACCAGGATTAATATAAACCCCTAGATGATTAAAAAGTCAATTATTATTATTTATTGGAGTAAATTTAACATTCT
TTTATTCACCTGATACCCCTTACTTACCAGGATTAATATAAACCCCTAGATGATTAAAAAGTCAATTATTATTATTTATTGGAGTAAATTTAACATTCT
TTTATTCACCTGATACCCCTTACTTACCAGGATTAATATAAACCCCTAGATGATTAAAAAGTCAATTATTATTATTTATTGGAGTAAATTTAACATTCT
TTTATTCACCTGATACCCCTTACTTACCAGGATTAATATAAACCCCTAGATGATTAAAAAGTCAATTATTATTATTTATTGGAGTAAATTTAACATTCT
TTTATTCACCTGATACCCCTTACTTACCAGGATTAATATAAACCCCTAGATGATTAAAAAGTCAATTATTATTATTTATTGGAGTAAATTTAACATTCT

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
....|
TTCCCTCAACATTTTCTAGGATTAGCAGGGATACC-TCGACGATACTCAGACTATCCAGATGCATACACAACATGAAA-TATTATCTCAACTATTGG-TTC
TTCCCTCAACATTTTCTAGGATTAGCAGGGATACC-TCGACGATACTCAGACTATCCAGATGCATACACAACATGAAA-TATTATCTCAACTATTGG-TTC
TCCCACAACACTTTTCTAGGTTTAGCAGGAATACC-TCGACGATACTCAGACTATCCAGATGCTTATACAACATGAAA-TATTATCTCAACTATTGG-ATC
TCCCCACAACACTTCTTAGGACTAGCAGGTATACC-TCGACGATACTCAGACTATCCAGATGCATACACAACATGAAAATATTATTCTGACTATTGG-GTC

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
A. pickeli, Manaus/AM/BRA ATAAATTTG-GGTCCTCTCCTCCAGCAGGGTCTGAAGAATG--ATGTATTTTAAA-TTTCGAT-CTGTTAA-----TAGTAT-TGT-AATTGCACCAGCT
A. pickeli, Natal/RN/BRA ATAAATTTG-GGTCCTCTCCTCCAGCAGGGTCTGAAGAATG--ATGTATTTTAAA-TTTCGAT-CTGTTAA-----TAGTAT-TGT-AATTGCACCA-CT
A. pickeli, Cochabamba/BOL ATAAATTTG-GGTCCTCTCCTCCAGCAGGGTCTGAAGAATG--ATGTATTTTAAAC-TTTCGAT-CTGTTAA-----TAGTAT-TGT-ACTTGCACCAGCT
A. pickeli, Linhares/ES/BRA ATAAATTTG-GATCTCTCTCCTCCGGCAGGGTCTGAAGAATG--ACGTATTTTAAA-TTTCGAT-CTGTTAA-----TAGTAT-TGT-AATTGCACCAGCT
A. pickeli, Teixeira./BA/BRA ATAAATTTG-GATCTCTCTCCTCCGGCAGGGTCTGAAGAATG--ACGTATTTTAAAATTTTCGATTCTGTTAA-----TAGTAT-TGT-AATTGCACCAGCT
A. pickeli, Asuncion/PRY ATAAATTTG-GATCCCCCTCCTCCAGCAGGATCCAAAAATGTGATGTGATTAAATTTTCGAT-CTGTTAA-----CAACAT-AGTTAATTGCACCAGCT
A. striata, Manaus/AM/BRA ATATTTTTATGGACTA--CCTTCAGGCACCCGACACATGGAACGCGTC--AGCTTTTGCAA-TTTCGCG-CATTTTAGCCAATGCT-TCGCGAGAGCT
A. serpentina, Manaus/AM/BR ATATATTTATGGACTA--CCTTCAGGCACC--CGACACATGGAACGCGTCACAGCTTATGCGATATTTGCGACATTATAGCCAATGCTATCTCGAGAGCT

 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
A. pickeli, Manaus/AM/BRA AG--AACT-GGTAAGGA--TAAAAGTAATAATA-GGGCTGTTAA-TACTACA--GCTCATA-C-GAAT-AATGGTATTC-GATCAA--ATGTT-ATACC
A. pickeli, Natal/RN/BRA AG--AACTGG-TAAGGA--TAAAAGTAATAATA-GGGCTGTTAA-TACTACA--GCTCATA-C-GAAT-AATGGTATTC-GATCAA--ATGTT-ATACC
A. pickeli, Cochabamba/BOL AG--AACTGG-TAAGGA--TAAAAGTAATAATA-GGGCTGTTAA-TACTACA--GCTCATA-C-GAAT-AATGGTATTC-GCTCAA--CTGTT-ATACC
A. pickeli, Linhares/ES/BRA AG--AACT-GGTAAGGA--TAAAAGTAATAATA-GGGCTGTTAA-TACTACA--GCTCATA-C-GAAT-AATGGTATTC-GATCAA--ATGTT-ATACC
A. pickeli, Teixeira./BA/BRA AG--TACTGGTAAAGGATTAAAAGTAATAATAAGGGCTGTTAAATACTACA--GCTCATA-C-GAATTAATGGTATTCCGATCAA--ATGTTTATACCC
A. pickeli, Asuncion/PRY AG--TACTGG-TAAGGA-TAAAAGTAATAATA-ATGCTGTTTAAATACTACA--GCTCATAACAAAATAAAGGATTC-GATCAA--ATGTTTATACCC
A. striata, Manaus/AM/BRA AGG-TAGTAG--TCCGT--TCGTACTCGTAATA-GCCCTGTTAA-TATAGCAGCGTTAA-CCC-TAAT--TCGTTACTC-CTTGGA--ATGTT-ATACC
A. serpentina, Manaus/AM/BR GGTATAGTAGGTACCGTTCTCGTACTCGTTATACGCCAG--AATTATAGCACC GTTAAGCCC-TAATTGTGCTTACTCACTTGGATAATGTTATTGTA-

 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
A. pickeli, Manaus/AM/BRA TGTAGAGCGTAT-ATTAATTA---CTGTT-GTAATAAAAT--TAC--TGCCCCCT-AGGATT-GATGAAATACCCG-CTAGATG-TAATGA--AAAAAT
A. pickeli, Natal/RN/BRA TGTAGAGCGTAT-ATTAATTA---CTGTT-GTAATAAA--TTTAC--TGCCCCCT-AGGATT-GATGAAATACCCG-CTAGATG-TAATGAA-AAA-AT
A. pickeli, Cochabamba/BOL TGTAGAGCGTAT-ATTAATTA---CTGTT-GTAATAAA--TTTAC--TGCCCCCT-AGGATT-GATGAAATACCTG-CTAGATG-TAATGAA-AAA-AT
A. pickeli, Linhares/ES/BRA TGTAGAGCGTAT-ATTAATTA---CTGTT-GTAATAAAAT--TAC--TGCCCCCT-AGGATT-GATGAAATACCCG-CTAGATG-TAATGA--AAAAAT
A. pickeli, Teixeira./BA/BRA TGTAGAGCGTAT-ATTAATTA---CTGTTTGTAAATAAAATTTACG-TGCCCCCT-AGGATTGATGAAATACCCG-CTAGATG-TAATGAA-AAA-AT
A. pickeli, Asuncion/PRY AGTGGATCGTATGATTAAATAA---CTGTAGTAAATAAA--TTTAC--TGCTCTTAAAAATGATGAAATCTCTG-CTAAATG-TAGTGAA-AAACAT
A. striata, Manaus/AM/BRA AGTAGTCCAAG-ATTGTGCACTCCTGCTACCGATCAGA---TTTACACTGGCGGC-ACGAGT---TGCGGTACTCTGTGATAGTGTGATAGCAGGA---
A. serpentina, Manaus/AM/BR -ACAGCTCCAAG-ATTGTGCGAT--ATGCTACCGATCAGA---ATACACTGG-GG---CGAGT---TGCGGTACTCTGTGATAGCTGATAGCAGGA---

 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
A. pickeli, Manaus/AM/BRA AGCTAAATCTACTGAGGCTCCTCCATGAGCGATTAA-AGATGATA-GGGGAGGGTAAACAGTTT-ATCCTGTACCAGCCC--CGTTTTCTACTATACTAC
A. pickeli, Natal/RN/BRA AGCTAAATCTACTGAGGCTCCTCCATGAGCGATTAA-AGATGATA-GGGGAGGGTAAACAGTTT-ATCCTGTACCAGCCC--CGTTTTCTACTATACTAC
A. pickeli, Cochabamba/BOL AGCTAAATCTACTGAGGCTCCTCCATGAGCGATTAA-AGATGATA-GGGGAGGGTAAACAGTTT-ATCCTGTACCAGCCC--CGTTTTCTGCTATACTAC
A. pickeli, Linhares/ES/BRA AGCTAAATCTACTGAGGCTCCTCCATGAGCGATTAA-AGATGATA-GGGGAGGGTAAACAGTTT-ATCCTGTACCAGCCC--CGTTTTCTACTATACTAC
A. pickeli, Teixeira./BA/BRA AGCTAAATCTACTGAGGCTCCTCCATGAGCGATTAA-AGATGATA-GGGGAGGGTAAACAGTTT-ATCCTGTACCAGCCC--CGTTTTCTACTATACTAC
A. pickeli, Asuncion/PRY AGCTAAATCTACTGAGGCTCCTCCATGAGCGATTAA-AGATGATA-GGGGAGGGTAAACAGTTT-ATCCTGTACCAGCCC--CATTTTCTACTATACTAC
A. striata, Manaus/AM/BRA AGTCTAGTCC---GAGCTTTGTCTCGCAGGCCAGGATACACGAA--GATGAGCCAGCCCTTAGTCATGT-CAACCTTAACGTCGTCGA-TATGCTTC
A. serpentina, Manaus/AM/BR AGTCTAGTCC---GAGCTTTGTCTCGCAGGCCAGGATACACGAAATAAGAGCCAGCCCTTAGTCATGT-C-TCTTTAACGTCGTC-A-TATGCTTC

	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
<i>A.pickeli</i> , Manaus/AM/BRA		TTAC--TA-GTAAGAGTGTAAAGG-GAGGGGGGTAGTAACCAAAATCTTATATTGTTTATT-CGTGGGAATG-CTATAT-CAGGTGCTCCTAATATTAATG								
<i>A.pickeli</i> , Natal/RN/BRA		TTAC--TA-GTAAGAGTGTAAAGG-GAGGGGGGTAGTAACCAAAATCTTATATTGTTTATT-CGTGGGAATG-CTATAT-CAGGTGCCCCCTAATATTAATG								
<i>A.pickeli</i> , Cochabamba/BOL		TTAG--TA-GTAAGAGTGTAAAGG-GAGGGGGGTAGTAACCAAAATCTTATATTGTT-ATT-CGTGGGAATG-CTATAT-CAGGTGCTCCTAATATTAATG								
<i>A.pickeli</i> , Linhares/ES/BRA		TTAC--TA-GTAAGAGTGTAAAGG-GAGGGGGGTAGTAGTCAAAATCTTATATTGTTTATT-CGTGGGAATG-CTATAT-CAGGTGCCCCCTAATATTAATG								
<i>A.pickeli</i> , Teixeira./BA/BRA		TTAC--TA-GTAAGAGTGTAAAGG-GAGGGGGGTAGTAGTCAAAATCTTATATTGTTTATT-CGTGGGAATG-CTATAT-CAGGTGCCCCCTAATATTAATG								
<i>A.pickeli</i> , Asuncion/PRY		TTAC--TA-GTAGTAATGTAAGA-GAAGGAGGTAAATAATCAAAATCTTATATTATTATT-CGTGGAAATG-CTATAT-CAGGTGCTCCTAGTATTAGAG								
<i>A.striata</i> , Manaus/AM/BRA		TTATAGTAAGCAGTCGCATACCTCAACGCTCTCTGGACGCGTAGCGTTCTTTGATTCCCTCGTGTATACCTGGCTTGGCAGCAATGAGCTCAGACT--ACT								
<i>A.serpentina</i> , Manaus/AM/BR		TTATAGTAAGCAGTCGCATACCTCAACGCTCTCTGGACGCGTAGCGTTCTTTGATTCCCTCGTGTAT-CCTGGCTTGGCAGCAATGAGCTCAGACT--ACT								
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
<i>A.pickeli</i> , Manaus/AM/BRA		GTA-CTAATCAATTTCCAAATCCTCCAATT-AT-----AATA--GGTAT-TACCATAAAAAAAA-TT-----ATG-ACAAAT---GCGTGA-GC-TGT-GA								
<i>A.pickeli</i> , Natal/RN/BRA		GTA-CTAATCAATTTCCAA-TCCTCCAATT-AT-----AATA--GGTAT-TACCATAAAAAAAA-TT-----ATA-ACAAAT---GCGTGA-GC-TGT-GA								
<i>A.pickeli</i> , Cochabamba/BOL		GTA-CTAATCAATTTCCAACTCCTCCAATT-AT-----AATA--GGTAT-TACCATAAAAAAAA-TT-----ATA-ACAAAT---GCGTGA-GC-TGT-GA								
<i>A.pickeli</i> , Linhares/ES/BRA		GTA-CCAATCAATTTCCAAATCCTCCAATT-AT-----GATA--GGTAT-TACTATAAAAAAAA-TT-----ATA-ACAAAT---GCGTGA-GC-TGT-GA								
<i>A.pickeli</i> , Teixeira./BA/BRA		GTA-CCAATCAATTTCCAAATCCTCCAATT-AT-----GATACGGGTAT-TACTATAAAAAAAAATT-----ATA-ACAGAATTGGCGTGA-GC-TGTTGA								
<i>A.pickeli</i> , Asuncion/PRY		GTA-CTAATCAGTTTCCAAATCCTCCAATTAT-----AATA--GGTAT-TACTATAAAAAAAA-TT-----ATA-ACAAAT---GCGTGA-GC-TGTT-A								
<i>A.striata</i> , Manaus/AM/BRA		GTGCGTCATGA---CTACGTCCGCTAGTAGATTACCCACAACAGTTA-CCTGTGTACAGAAGATCAA-TGATC-ACCGAG-GACTGTTGTCC-TATCTC								
<i>A.serpentina</i> , Manaus/AM/BR		GTGCGTCATGAT---CTACGTCCGCTAGTAGATTACCCACAACAGTTA-CCTGTGTACAGAAGATCAATTGATCTACCGAGTGACTGTTGTCCATATCTC								
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
<i>A.pickeli</i> , Manaus/AM/BRA		-CAATAACATTATAAATTTGATC-ATCTCCAATT-AATGCTCCT--GGGTGTCCTAATT--CAGTTCGAATT-AGAATTCCTAAG-GGATGTTCTCTACT-A								
<i>A.pickeli</i> , Natal/RN/BRA		-CAATAACATTATAAATTTGATC-ATCTCCAATT-AATGCTCCT--GGGTGTCCTAATT--CAGTTCGAATT-AGAATTCCTAAG-GGATGTTCTCTACT-A								
<i>A.pickeli</i> , Cochabamba/BOL		-CAATAACATTATAAATTTGATC-ATCTCCAATT-AATGCTCCT--GGGTGTCCTAATT--CAGTTCGAATT-AGAATTCCTAAG-GGATGTTCTCTACT-A								
<i>A.pickeli</i> , Linhares/ES/BRA		C-AATAACATTATAAATTTGATC-ATCTCCAATT-AGTGCTCCT--GGGTGCCCTAATT--CAGTTCGAATT-AGAATTCCTAAG-GGATGTTCTCTACT-A								
<i>A.pickeli</i> , Teixeira./BA/BRA		CCATTACATTATAAATTTGATCCTCTCCAATTTAGTGCTCCCTGGGGTGCCCTAATT--CAGTTCGAATTTAGAATTCTAAG-GGATGTTCTCTACT-A								
<i>A.pickeli</i> , Asuncion/PRY		CAATTTACATTATAAATTTGATC-ATCTCCAATTAAAGGCTCCT-GGAATGTTCTAGTT--CAGTTCGAATT-AGGATTCTAAGCAGATGTTCCCACTTA								
<i>A.striata</i> , Manaus/AM/BRA		-TAGTCACATTCTGTCTCTGAAC-CTTGTCAATGAGCGCAGAG---ACTACGGATATTTGCTTGTAGAAA--TCCTTGATATAGCGCTGGCTAAACCGA								
<i>A.serpentina</i> , Manaus/AM/BR		CTAGTCACATTCTGTCTCTGAAC--CTTGTCAATGAGCGCAGAG---ACTACGGATATTTGCTTGTAGAAA--TCCTTGATATAGCGCTGGCTAAACCGA								
	710	720	730	740	750	760	770	780		
<i>A.pickeli</i> , Manaus/AM/BRA		TGC-CGGCTCATGCACCGAAAATAAAATATAAAGTTCCGAT--ATCTTTATGATTTGTTGAAAATAAT-CATTGTC-GCG								
<i>A.pickeli</i> , Natal/RN/BRA		TGC-CGGCTCATGCACCGAAAATAAAATATAAAGTTCCGAT--ATCTTTATGATTTGTTGAAAATAAT-CATTGTC-GCG								
<i>A.pickeli</i> , Cochabamba/BOL		TGC-CGGCTCATGCACCGAAAATAAAATATAAAGTTCCGA--ATCGGTATGATTTGTTGAAAATAAT-CATTGTC-GCG								
<i>A.pickeli</i> , Linhares/ES/BRA		TGC-CAGCTCATGCACCGAAAATAAAATATAAAGTTCCGAT--ATCTTTATGATTTGTTGAAAATAAT-CATTGTC-GCG								
<i>A.pickeli</i> , Teixeira./BA/BRA		TGC-CAGCTCATGCACCGAAAATAAAATATAAAGTTCCGATATTCTTTATGATTTGTTGAAAATAAT-CATTGTC-GCG								
<i>A.pickeli</i> , Asuncion/PRY		TAC-CGGCTCATGCTCCGAAAATAAAATTTAATGTTCCACT--ATCTTTATGATTTGTTGAAAATAAT-CATTGTC-GCG								
<i>A.striata</i> , Manaus/AM/BRA		TGTACGGTTAACTGACCAAACTCAAATCGTCATTTTGCA--ATTCGATGCTGCAGGAGCTAGACGACACTCTATCAG--								
<i>A.serpentina</i> , Manaus/AM/BR		TGTAC-GTTAACTGACCAAACTCAAATCGTCATTTTGCA----TTCGATGCTGCAGGAGCTAGACGACACTCTATCA---								