Leandro Fontes Prezotto

Análise do ITS1 do DNA ribossômico em
espécies do complexo *Anastrepha*
fraterculus (Diptera: Tephritidae).

São Paulo

2008

Leandro Fontes Prezotto

Análise do ITS1 do DNA ribossômico em
espécies do complexo *Anastrepha*
fraterculus (Diptera: Tephritidae).

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para
a obtenção de Título de Mestre
em Ciências, na Área de
Genética e Biologia Evolutiva.

Orientadora: Profa. Dra. Denise
Selivon-Scheepmaker

São Paulo

2008

Prezotto, Leandro Fontes

Análise do ITS1 do DNA ribossômico em espécies do complexo *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae).

66 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Moscas-das-Frutas 2. Filogenia 3. Espécies-Praga I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Denise Selivon-Scheepmaker
Orientador(a)

Aos meus pais,

"To do something well is so worthwhile that to die trying to do it better cannot be foolhardy. It would be a waste of life to do nothing with one's ability, for I feel that life is measured achievement, not in years alone"

Bruce McLaren 1937-1970

Agradecimentos

A Dra. Denise Selivon-Scheepmaker, por ter me aceito como orientadora e pelos incentivos ao longo da execução deste trabalho.

Ao Dr. André Luiz Paranhos Perondini, pela colaboração e incentivos principalmente nos momentos decisivos deste trabalho.

Ao Dr. Vicente Hernández-Ortiz, por ter cedido o material coletado em diversos países da América Latina.

Ao Rodrigo de Oliveira Mascarenhas, por ter me ensinado a fazer as análises filogenéticas com o programa POY.

A Virginia Elias Coscrato, pela ajuda no desenho dos iniciadores.

Aos amigos que estão ou que passaram pelo laboratório: Adriana, Aline, Camila, Carla, Fabiana, Felipe, Lincoln, Rafael, Roberto, Rominy e Thaís, pela ajuda em diversos momentos deste trabalho.

A Elzi, pela ajuda nas coletas e manutenção do material biológico.

Aos meus pais e irmãs, Tarcisio, Regina, Renata e Carolina, pelo carinho e apoio dado, principalmente nos momentos mais difíceis.

Apoio financeiro Capes (bolsa institucional de Mestrado) e FAPESP (Projeto Temático 03/02698-3).

Índice

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	10
MATERIAL E MÉTODOS	11
Espécies, locais de coleta e frutos hospedeiros	11
Análise do ITS1	15
<i>Extração de DNA</i>	15
<i>Amplificação do ITS1</i>	15
<i>Eletroforese</i>	16
<i>Clonagem</i>	18
<i>Seqüenciamento de DNA</i>	18
<i>Análise Filogenética</i>	19
RESULTADOS	21
I. Análise das amostras de populações do Brasil	21
Frequência de bases e índice de similaridade	21
Análises filogenéticas	23
II. Amostras da América Latina	30
Frequência de bases e índice de similaridade	30
Análises filogenéticas	33
DISCUSSÃO	39
CONCLUSÃO	49
RESUMO	51
SUMMARY	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXO	61

INTRODUÇÃO

Nos eucariontes, os genes que codificam o RNA ribossômico estão organizados em unidades repetidas em *tandem* agrupadas em uma ou mais regiões cromossômicas (Flavell & O'Dell, 1979; Long & Dawid, 1980; Elder & Turner, 1995). Cada unidade possui seqüências codificadoras altamente conservadas e seqüências intercalares que, em geral, variam dentro e entre populações. De forma geral, cada unidade de repetição do DNAr eucarionte consiste de: um espaçador externo (ETS, do inglês *external transcribed spacer*), transcrito em uma seqüência que contém a extremidade 5' da molécula precursora do RNAr; uma região que codifica para o RNAr 18S; um espaçador interno que é transcrito (ITS1, do inglês *internal transcribed spacer*); a região que codifica o RNAr 5.8S; outro espaçador interno (ITS2); uma região que codifica para o RNAr 25-28S e um espaçador externo (NTS, de *non transcribed spacer*), que não é transcrito (Favell & O'Dell, 1979; Long & Dawid, 1980; Elder & Turner, 1995); as cópias das unidades de repetição do DNAr são separadas pelo espaçador não-transcrito (NTS) (Hillis & Dixon, 1991). Os espaçadores reconhecem sinais para processar a transcrição do RNAr (Hillis & Dixon, 1991). A região dos espaçadores (ITS) apresenta uma alta taxa de divergência quando comparada com as seqüências codificadoras dos RNAr 18S, 5.8S e 28S (Schlötterer, *et al.*, 1994).

A escolha das seqüências mais apropriadas para responder uma questão em particular é o passo mais crítico em qualquer análise filogenética. Se a região escolhida for muito conservada, isto é, se as seqüências forem muito semelhantes entre si, as diferenças não serão suficientes para uma análise adequada. Por outro lado, regiões muito variáveis são difíceis para alinhar, além de gerarem alinhamentos questionáveis (Swofford & Olsen, 1990). Há duas razões para seqüências altamente divergentes gerarem resultados questionáveis: (1) o nível de homoplasia (paralelismo, convergência e reversão) aumenta à medida que a probabilidade de mudança em cada posição aumenta e (2) o número de possíveis alinhamentos torna-se consideravelmente grande (Swofford & Olsen, 1990).

Embora não haja regras absolutas, alinhamentos gerados por seqüências que sejam divergentes em mais de trinta por cento entre si são ambíguos. As melhores regiões do DNA para estudos filogenéticos são aquelas que possuem similaridade maior que setenta e menor que cem por cento (Hillis & Dixon, 1991).

Uma das razões pelas quais o DNAr é útil para análises filogenéticas, está no fato de que as diferentes regiões da unidade de repetição do DNAr evolui a taxas diferentes (Hillis & Dixon, 1991). Assim regiões que são particularmente susceptíveis a produzir dados informativos podem ser selecionadas para análises.

O problema inicial da região espaçadora ITS é o fato de ocorrer em múltiplas cópias no genoma nuclear, havendo uma potencial variação intragenômica (Coleman, 2007). Segundo autores como Arnheim (1983), Álvarez & Wendel (2003) e Coleman (2003; 2007), estas repetições estariam sujeitas a uma “evolução em concerto” (Dover, 1982; 1986), um mecanismo pouco compreendido de homogeneização que torna as várias cópias do ITS idênticas em um organismo em pouco tempo evolutivo. Assim os espaçadores podem ser tratados como um gene único (Coleman, 2003; 2007).

Diversos estudos que procuraram estabelecer a filogenia de um grupo foram bem sucedidos ao utilizar o ITS. Esses espaçadores podem ser usados para inferir filogenia entre espécies próximas, para a identificação de espécies ou linhagens, para estudos de hibridização e como marcadores em genética populacional (Hillis & Dixon, 1991). Os métodos utilizados incluem a análise da sequência do DNA amplificado, a utilização de iniciadores e sondas de oligonucleotídeos gênero ou espécie-específicos e análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) (Iwen *et al.*, 2002). Os resultados destes estudos filogenéticos geralmente são consistentes com aqueles baseados em outras fontes de dados em estudos que envolvem múltiplas comparações (Hillis, 1987). Entretanto, em raros casos, a sequência de um ou dos dois espaçadores tem uma similaridade maior que 99% entre as espécies (similaridade interespecífica), dificultando a caracterização de uma espécie utilizando apenas esta ferramenta (Gaskell *et al.*, 1997; Iwen *et al.*, 2002).

Schlötterer *et al.* (1994) seqüenciaram o ITS1 e o ITS2 de cinco espécies do subgrupo *Drosophila melanogaster*, além de *D. pseudoobscura*, *D. virilis* e *Musca domestica*. Os autores encontraram um polimorfismo muito baixo (< 0,5%) entre as espécies de *Drosophila*, porém isto não representou um problema para a análise filogenética. Já Fenton *et al.* (1997) encontraram um polimorfismo entre 1 a 8 % ao seqüenciar amostras de seis espécies de carrapatos do gênero *Cecidophyopsis* e em *Phylcoptes gracilis*.

Rojas *et al.* (2007) seqüenciaram e clonaram a região completa do ITS1-5.8S-ITS2 e mais de 390 bases do gene 16S na identificação e filogenia de cinco espécies de ácaros *Rhinonyssus* encontradas em Sevilla, Espanha. Os resultados mostraram que tanto a região dos espaçadores quanto a do 16S exibiram um alto grau de similaridade entre as espécies estudadas. Além disso, os autores não encontraram polimorfismo intraindividual significativo (de zero a três bases entre os clones). Apesar da alta similaridade, a região dos espaçadores se mostrou uma ferramenta útil para responder questões filogenéticas para estas espécies, o mesmo não ocorrendo com o 16S, que não se mostrou um bom marcador para relacionar táxons distantes.

A região ITS2, isoladamente, tem-se mostrado útil na análise comparativa entre táxons. Fritz *et al.* (2004) amplificaram e seqüenciaram o ITS2 para amostras de 17 espécies de *Anopheles* de diversas regiões dos Estados Unidos, Brasil, Venezuela, Suriname, Bolívia, Colômbia e Equador. Em quatro espécies, *An. triannulatus*, *An. trinkae*, *An. strodei* e *An. rangeli* foi possível o desenho de iniciadores espécie-específicos para determinadas regiões do ITS2. Através desta técnica (PCR Multiplex) foi possível identificar estas quatro espécies apenas pelo tamanho dos fragmentos gerados na sua amplificação.

Marrelli *et al.* (2007) seqüenciaram o ITS2 de 15 espécies do percevejo *Amblyomma* de diversas regiões do Brasil (São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia e Goiânia), também encontrando divergências significativas, possibilitando o uso de seqüências do ITS2 na diagnose destas espécies.

Li *et al.* (2003) amplificaram e seqüenciaram o ITS1 do mosquito *Culicoides arakawe* e compararam com seqüências de outras nove espécies de *Culicoides* depositadas no GenBank. De acordo com os resultados obtidos, as dez espécies puderam ser divididas em dois grandes grupos e foi mostrado que o ITS1 destas espécies apresentava uma região altamente conservada de cem bases no centro da seqüência, permitindo o desenho de iniciadores gênero-específicos e espécie-específicos flanqueando a região variável com o objetivo de diferenciar espécies desse grupo de insetos.

Em outro estudo filogenético com ITS1 em 35 espécies de *Culicoides*, Perrin *et al.* (2006) separou-as em oito clados. Além disso, os autores incluíram análises

morfológicas e ecológicas para as espécies estudadas e chegaram a resultados semelhantes aos obtidos com as seqüências de ITS1.

O complexo de espécies *Anopheles gambiae* foi caracterizado pela análise da região interespaçadora do DNA ribossômico, o que foi corroborado por análises cromossômicas (Gentile *et al.*, 2002; Sedaghat *et al.*, 2003).

Esses resultados mostram que as regiões espaçadoras do DNAr (ITS) podem ser especialmente úteis para análises de relações filogenéticas e/ou caracterização de espécies em diversos organismos que incluem grupos de difícil identificação taxonômica ou que apresentam conjuntos de espécies crípticas. Um grupo de organismos que apresenta algumas dessas particularidades é o das moscas-das-frutas da família Tephritidae onde a existência de espécies crípticas é comum (revisão em White & Elson-Harris, 1992).

As moscas-das-frutas da família Tephritidae têm sido estudadas por diversos grupos de pesquisa em âmbito mundial, muito pelo fato de várias espécies desses insetos serem considerados pragas por causarem prejuízo à fruticultura.

A família Tephritidae congrega espécies que caracteristicamente se desenvolvem em tecidos vegetais vivos. Várias espécies utilizam frutos como substrato alimentar no estágio de larva, adquirindo o status de inseto-praga quando esses frutos são de valor comercial. As espécies-praga pertencem aos gêneros *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Ceratitis*, *Dacus*, *Rhagoletis* e *Toxotrypana* (White & Elson-Harris, 1992).

Análises das regiões interespaçadores do DNAr foram realizados em moscas-das-frutas.

Armstrong & Cameron (2000) amplificaram e analisaram por RFLP o ITS1 de seis espécies de *Anastrepha* (entre elas *A. fraterculus* s.l.), *Ceratitis capitata*, quinze espécies de *Bactrocera*, *Dacus solominensis* e *Rhagoletis completa*. O marcador foi diagnóstico entre todos os gêneros, entre três espécies de *Anastrepha*, e entre seis de *Bactrocera*. O ITS1 se mostrou um bom marcador molecular utilizado na identificação de estágios imaturos de Tephritidae e tem sido aplicado, com sucesso, na vistoria de frutos infestados nas alfândegas da Nova Zelândia, Austrália e Estados Unidos (Armstrong *et al.*, 1997; Armstrong & Cameron, 2000).

Foi mostrado que em *Ceratitis capitata* existem três espaçadores internos (ITS1, ITS2a e ITS2) separando os genes 18S, 5.8S, 2S e 28S e, ainda, um espaçador externo localizado ao lado do gene 18S (Douglas & Haymer, 2001).

Estrutura similar foi observada em *Anastrepha suspensa* e *A. fraterculus sensu lato* por Fritz (2006). Ainda não se conhece a estrutura das unidades do DNAr em outras espécies de moscas-das-frutas.

Utilizando o seqüenciamento do ITS1 para amostras de *C. capitata* do Havaí, Costa Rica, Guatemala, Peru, Espanha, Grécia, e *C. rosa* do Quênia e África do Sul, Douglas & Haymer (2001), não encontraram polimorfismos no tamanho das seqüências de *C. capitata*. Porém, encontraram diferenças para as duas amostras de *C. rosa*. Desta forma, o ITS1 pode ser utilizado como ferramenta diagnóstica para distinguir indivíduos de *C. rosa* do Quênia e da África do Sul e entre *C. rosa* e *C. capitata*.

Young & Coleman (2004) utilizaram seqüências do ITS2 na reconstrução filogenética de *Ceratitis*, três espécies de *Bactrocera*, *Musca domestica* e dezoito espécies de *Drosophila*. Os resultados obtidos não conflitaram com estudos prévios que utilizaram outras ferramentas.

Fritz (2006) seqüenciou o ITS2 de *Anastrepha suspensa*, comparando-a com amostra depositada no GenBank de *A. fraterculus s.l.* (acessos números AF210891, AY693651 e AY775552) e encontrou divergências significativas entre as amostras.

O gênero *Anastrepha* é endêmico do Continente Americano e compreende cerca de 200 espécies descritas, das quais 99 ocorrem no Brasil (Zucchi, 2007). Norrbom *et al.* (1999) com base em características morfológicas, agruparam as espécies de *Anastrepha* em dezessete grupos infragenéricos. Posteriormente, McPherson *et al.* (1999), corroboraram os resultados obtidos por Norrbom *et al.* (1999). Barr *et al.* (2005) corroboraram estes resultados através da análise da região hipervariável do gene *period*.

Dentre os grupos, um dos que tem recebido bastante atenção nos últimos anos é o grupo *fraterculus* por congregar muitas das espécies-praga (White & Elson-Harris, 1992; Aluja, 1994), incluindo *A. fraterculus s.l.*

Existem várias espécies morfológicamente similares a *Anastrepha fraterculus*, o que pode ser um indicativo de que o grupo infragenérico *fraterculus*, que inclui cerca de 27 espécies, tenha uma história evolutiva recente (Aluja, 1994; McPherson *et al.*, 1999; Norrbom *et al.*, 1999; Smith-Caldas *et al.*, 2001).

Dentre estas, a espécie de maior importância econômica é *A. fraterculus (sensu lato)* (Wiedemann), distribuída nas Américas entre as latitudes 35° N e 35° S (Malavasi *et al.*, 2000), abrangendo desde o norte do México ao centro da Argentina

e norte do Chile (Basso *et al.*, 2003), ocupando ambientes bastante distintos. É uma espécie generalista sendo que mais de 90 de frutos hospedeiros são conhecidos (Malavasi, 2000; Zucchi, 2007). Como sugerido por Selivon *et al.* (2004b), é possível que esta extensa lista de hospedeiros deva estar relacionada com a dificuldade de reconhecer as diferentes espécies crípticas que integram a espécie nominal *A. fraterculus*.

A possibilidade da existência de espécies crípticas foi aventada na década de 1940, quando Stone (1942) reconheceu em *A. fraterculus* uma extensa variação na morfologia das asas, mas preferiu considerá-las como raças geográficas. Em 1944, Baker *et al.*, sugeriram que, na verdade, um complexo de espécies crípticas estaria envolvido. Mendes (1958) e Bush (1962) analisando amostras do Brasil e do México, respectivamente, descobriram diferenças cariotípicas entre amostras das duas regiões. Morgante *et al.* (1980) através de eletroforese de isozimas estudaram 11 locos enzimáticos para 16 populações de *A. fraterculus* das regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil. Os autores consideraram o “complexo *fraterculus*” constituído por quatro subgrupos populacionais e sugeriram que as populações do Nordeste apresentavam alguma diferenciação em relação às do Sudeste e Sul. Posteriormente, Solferini & Morgante (1987) descreveram quatro cariótipos nas amostras de diferentes populações brasileiras de *A. fraterculus*, dois presentes no estado de São Paulo e dois no estado da Bahia. Entretanto, verificou-se posteriormente que um dos cariótipos descritos para a população da Bahia, na verdade pertencia a espécie *A. sororcula* (Morgante *et al.*, 1993).

Steck (1991) em um estudo de isozimas descreveu que amostras do nordeste do Brasil (Bahia), costa da Venezuela, Costa Rica e México eram similares, porém indivíduos de populações do sudeste do Brasil, Venezuela andina e Peru, eram geneticamente distintos. Em 1994, Amaral estudou sete locos enzimáticos em larvas de *A. fraterculus* s.l. de populações brasileiras e corroborou as conclusões dos trabalhos anteriores (Morgante *et al.*, 1980; Steck, 1991). O autor considerou a possibilidade de esta diferenciação estar relacionada a fatores como altitude e distribuição geográfica. Na Argentina, estudos realizados com isozimas por Alberti *et al.* (1999, 2002) demonstraram a existência de baixos níveis de variabilidade genética entre amostras de populações de *A. fraterculus* daquele país, indicando a possível presença de apenas uma espécie do complexo *A. fraterculus*.

A mesma conclusão foi posteriormente corroborada por análises cromossômicas (Basso *et al.*, 2003)

Steck & Sheppard (1993), estudando a variação do DNA mitocondrial em *A. fraterculus*, confirmaram a diferenciação entre as populações das regiões Nordeste e Sudeste do Brasil. Santos (1994) estudou o DNA mitocondrial de três espécies de *Anastrepha* e encontrou maior variabilidade para *A. fraterculus* do que nas espécies *A. sororcula* e *A. obliqua*. Reconheceu a existência de dois haplótipos dentro da espécie nominal *A. fraterculus*, o que estaria de acordo com os resultados acima mencionados.

Smith-Caldas *et al.* (2001) utilizando o gene mitocondrial *citocromo oxidase I* (COI) para 15 espécies de *Anastrepha*, sendo 12 do grupo *fraterculus*, encontraram diversas entidades de *A. fraterculus* em diferentes regiões do Brasil, das Américas Andina e Central.

Na análise do ITS1 de várias espécies de *Anastrepha*, Armstrong & Cameron (2000), encontraram diferenças significativas em distintas amostras da espécie nominal *A. fraterculus*.

Todas essas análises davam suporte às sugestões de que a espécie nominal *A. fraterculus* realmente abrigaria um complexo de espécies crípticas, o denominado "complexo *fraterculus*".

Selivon (1996) e Selivon *et al.* (2005) estudaram amostras de 10 populações de *A. fraterculus* utilizando uma abordagem multidisciplinar. Os resultados de uma análise genética englobando 19 locos isoenzimáticos indicaram a existência de duas entidades claramente distintas de *A. fraterculus* s.l., uma característica de populações de maiores altitudes (altiplanos-grupo 1) e outra característica de populações de áreas litorâneas (grupo 2). A existência desses dois grupos de populações foi confirmada por análise cromossômica e morfométrica de asas e ovopositores. Diferenças conspícuas foram encontradas nos cromossomos sexuais. A análise morfométrica separou claramente as duas entidades e indicou não haver diferenças significativas entre as amostras populacionais de cada grupo.

Além disso, Selivon *et al.* (1999, 2005) observaram indícios da existência de isolamento reprodutivo evidenciada pela redução significativa da taxa de eclosão das larvas em cruzamentos recíprocos feitos em laboratório entre indivíduos dos grupos 1 e 2. Nos cruzamentos entre fêmeas da entidade 2 com machos da entidade 1 ocorreu um desvio significativo na proporção sexual da progênie adulta,

com excesso de fêmeas que não foi observada nos cruzamentos recíprocos, estas observações refletem a existência de isolamento reprodutivo pós-zigótico. Diferenças morfológicas na ornamentação do córion dos ovos dos grupos 1 e 2, foram descritas por Selivon & Perondini (1998).

Com base nesses resultados, foram reconhecidas duas espécies do complexo *fraterculus*, denominadas provisoriamente de *A. sp.1 affinis fraterculus* e *A. sp.2 aff. fraterculus* (Selivon & Perondini, 1998, 2007; Selivon *et al.* 2005)

Selivon *et al.* (2004b) descreveram a existência de mais duas entidades no complexo *A. fraterculus*, denominadas de *A. sp.3 aff. fraterculus* e *A. sp.4 aff. fraterculus*¹. A primeira é encontrada no litoral e planalto das regiões Sul e Sudeste do Brasil e a segunda em Guayaquil, Equador. No estágio adulto, *A. sp.3* é claramente identificada pelos padrões do mesoescuto (ausência de listras claras longitudinais) e alar. A análise cariotípica mostrou a existência de diferenças nos cromossomos sexuais das duas espécies e em relação àqueles de *A. sp.1* e *A. sp.2*, tanto quanto ao tamanho como pela presença e distribuição de blocos de heterocromatina e diferenças também foram descritas relacionadas à morfologia dos ovos (Selivon *et al.*, 2004b, 2005). Posteriormente, análises cromossômicas detalhadas revelaram diferenças adicionais nos cromossomos sexuais das quatro espécies (Goday *et al.*, 2006).

Selivon *et al.* (2004a) fizeram uma análise de restrição do DNA ribossômico, por digestão com a enzima *EcoRI* e posterior hibridação com sonda do rDNA total de *Drosophila melanogaster*. O padrão de bandas foi claramente distinto para as espécies do complexo *fraterculus*. Além disso, Rocha & Selivon (2004) submeteram o DNA total de *A. sp.1*, *A. sp.2*, *A. sp.3* à clivagem por endonucleases de restrição. O padrão de bandas mostrou especificidade entre as espécies, sendo o padrão de *A. sp.3* mais distinto de *A. sp.1* e *A. sp.2* do que os padrões destas duas espécies entre si. Além da caracterização das espécies do complexo no Brasil, também há evidências da existência de diferentes entidades em outras regiões.

¹ No decorrer deste trabalho as quatro espécies já caracterizadas do complexo serão denominadas, abreviadamente, de *A. sp.1*, *A. sp.2*, *A. sp.3* e *A. sp.4*.

McPheron *et al.* (1999) ao analisar o RNA 16S mitocondrial de espécies de *Anastrepha*, encontraram duas entidades distintas para *A. fraterculus* s.l., uma em São Paulo e outra em Merida, na Venezuela.

Hernández-Ortiz *et al.* (2004) realizaram uma análise morfométrica do acúleo do ovipositor, asas e mesonoto de amostras populacionais de *A. fraterculus* s.l., coletadas em sete localidades no México (Apazapan, Emiliano Zapata, Teocelo, Coatepec, Los Tuxtlas, Chiapas e Quitana Roo), uma em Tucumán, Argentina, outra em La Mesa, Colômbia, uma em Piracicaba (SP) e outra em Caçador (SC), no Brasil. Os resultados mostraram diferenças significativas no acúleo e nas asas entre as amostras mexicanas e sul americanas. As variações observadas entre as populações do México foi extremamente baixa, sendo consideradas como um único morfotipo (morfotipo Mexicano). Foram caracterizados outros dois morfotipos, um Andino, consistindo da amostra colombiana e o morfotipo Brasileiro incluindo as duas populações brasileiras e a argentina. Os autores concluíram que os morfotipos do México, da Colômbia e do Brasil junto com a Argentina corresponderiam a três entidades distintas.

Desta forma, os dados obtidos indicam que, no momento, existem três entidades bem caracterizadas no Brasil (*A. sp.1*, *A. sp.2* e *A. sp.3*) (Selivon *et al.* 2004b, 2005), uma na Argentina (Alberti *et al.* 2002; Basso *et al.* 2003), uma no Equador (*A. sp.4*, Selivon *et al.* 2004b), uma na Colombia e outra no México (Hernández-Ortiz *et al.* 2004).

Muitas das análises feitas até o momento com o complexo *fraterculus* necessitam de material biológico vivo e em certos estágios do ciclo de vida. Entretanto, boa parte das amostras são obtidas a partir de exemplares coletados em armadilhas, inviabilizando certas análises. Assim, seria importante utilizar um marcador que pudesse ser utilizado em material obtido de armadilhas e também para amostras de qualquer fase do ciclo de vida desses insetos. Uma possibilidade é utilizar os espaçadores do DNA ribossômico dado os resultados prévios obtidos com diferentes espécies de *Anastrepha* com outras espécies de moscas-das-frutas.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Caracterização da variabilidade do espaçador ITS1 do DNA ribossômico de espécies do complexo *Anastrepha fraterculus*.

Objetivos Específicos:

- Caracterização do ITS1 de *A. sp.1*, *A. sp.2* e *A.sp.3*;
- Analisar a variabilidade do ITS1 das três espécies, em amostras populacionais de diversas localidades do Brasil;
- Análise desse espaçador em amostras de outras regiões das Américas do Sul, Central e México;
- Análise filogenética a partir de seqüências do ITS1 de espécies do complexo *fraterculus*, incluindo amostras do Brasil e de outras regiões do Continente Americano.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécies, locais de coleta e frutos hospedeiros

As amostras populacionais de espécies do complexo *fraterculus* estudadas neste trabalho foram coletadas no Brasil (Tabela I; Figura 1) e em outras localidades do Continente Americano (Tabela II; Figura 1).

Nas coletas realizadas no Brasil, os frutos coletados foram acondicionados em bandejas contendo uma camada de vermiculita e assim, levados ao laboratório até a emergência dos adultos, segundo metodologia descrita anteriormente (Selivon, 1996). Uma parcela dos adultos que emergiram foi preservada em nitrogênio líquido para as análises do ITS. Com outra parcela dos adultos, foram estabelecidas colônias no laboratório, segundo método já padronizado (Selivon, 1996).

Foram analisadas amostras de diversos pontos ao longo do Vale do Paraíba em São Paulo e Rio de Janeiro (Tabela I). Nesta região, *A. sp.1* e *A. sp.3* foram coletadas em goiabas (*Psidium guajava*), enquanto que *A. sp.2* foi coletada em laranjas (*Citrus sp.*). No litoral norte de São Paulo foram coletadas amostras de *A. sp.2* e *A. sp.3* em goiabas e chapéu-de-sol (*Terminalia cattapa*) respectivamente. Além disso, foram realizadas coletas no estado de Minas Gerais, onde foram coletadas *A. sp.1*, *A. obliqua* e *Ceratitis capitata* em frutos de goiaba, manga (*Mangifera indica* L.) e café (*Coffea arabica*), respectivamente. Em Botucatu (SP), foram coletadas amostras de *A. sp.1* e *A. obliqua* em goiaba e manga, respectivamente (Tabela I).

As amostras de outras regiões das Américas (Tabela II), México, Guatemala, Colômbia, Peru e Argentina, foram cedidas pelo Dr. Vicente Hernández-Ortiz, do Instituto de Ecología A.C.(Conacyt), Xalapa, Veracruz, México, e estavam conservados em etanol mantido a -20°C. A amostra de Guayaquil (Equador) estava disponível no laboratório e congelada em nitrogênio líquido (Selivon *et al.* 2004b).

Além dessas espécies de *Anastrepha*, foi feita uma análise do ITS1 em amostra de *Anastrepha obliqua*, coletada em Botucatu, SP e de uma amostra de *Ceratitis capitata* coletada em Guaxupé (MG) (Tabela I).

Tabela I. Localidade, coordenadas geográficas e hospedeiros das amostras populacionais do complexo *A. fraterculus*, *A. obliqua* e *C. capitata* coletadas no Brasil utilizadas para a análise do ITS1.

Código	Localidade	Coordenadas Geográficas	Hospedeiro	Entidade
TRios	Três Rios (RJ)	22°07'21"S 43°13'16"O	Goiaba (<i>Psidium guajava</i>)	<i>A. sp.1</i>
			Laranja (<i>Citrus sp</i>)	<i>A. sp.2</i>
SLPar	São Luís do Paraítinga (SP)	23°13'24"S 45°18'47"O	Goiaba	<i>A. sp.1</i>
				<i>A. sp.3</i>
Ubatu	Ubatuba (SP)	22°46'24"S 45°41'52"O	Chapéu-de-sol (<i>Terminalia cattapa</i>)	<i>A. sp.3</i>
			Goiaba	<i>A. sp.2</i>
IBela	Ilhabela (SP)	23°48'22"S 45°21'54"O	Goiaba	<i>A. sp.2</i>
SIsab	Santa Isabel (SP)	23°19'00"S 46°13'25"O	Goiaba	<i>A. sp.1</i> <i>A. sp.3</i>
			Laranja	<i>A. sp.2</i>
Botuc	Botucatu (SP)	22°56'18"S 48°18'25"O	Goiaba	<i>A. sp.1</i>
			Manga (<i>Mangifera indica</i> L.)	<i>A. obliqua</i>
Uberl	Uberlândia (MG)	18°56'46"S 48°13'55"O	Goiaba	<i>A. sp.1</i>
			Manga	<i>A. obliqua</i>
Guaxu	Guaxupé (MG)	21°17'35"S 46°43'20"O	Goiaba	<i>A. sp.1</i>
			Manga	<i>A. obliqua</i>
			Café (<i>Coffea arábica</i>)	<i>C. capitata</i>

Tabela II. Localidade, coordenadas geográficas e hospedeiros das amostras populacionais de *A. fraterculus* s.l. coletados em regiões da América Latina utilizadas para a análise do ITS1.

Código	Localidade	Coordenadas Geográficas	Hospedeiro
Arg-Mis	Argentina: Misiones, Posadas	27°23'59"S 55°56'01"O	Goiaba (<i>Psidium guajava</i>)
Arg-Conc	Argentina: Entre Ríos, Concordia	31°23'13"S 58°01'12"O	Goiaba
Arg-Tucu	Argentina: Tucumán	27°02'18"S 65°19'13"O	Goiaba
Arg-HMolle	Argentina: Tucumán, Horco Molle	26°46'37"S 65°19'49"O	Goiaba
Peru-Lmol	Peru: La Molina, Lab colony	12°14'15"S 76°31'50"O	Cherimoia (<i>Annona cherimola</i>)
Peru-Piura	Peru: Piura, Lab colony	7°40'23"S 79°12'40"O	Goiaba
Equad-Gua (A. sp. 4)	Equador: Guayaquil	2°12'13"S 79°53'50"O	Goiaba
Col-Tol	Colombia: Ibagué, Tolimá	4°26'11"N 75°11'29"O	Colônia de laboratório
Guat-City	Guatemala: Guatemala City	14°36'51"N 90°32'22"O	Goiaba
Mex-Tap	Mexico: Chiapas, Tapachula	14°53'47"N 92°10'30"O	Goiaba e Nêspira (<i>Eriobotrya japonica</i>)
Mex-QRoo	Mexico: Quitana Roo, Chunhuhub	19°37'39"N 88°38'56"O	Armadilha McPhail
Mex-Teoc	Mexico: Veracruz, Teocelo	19°23'14"N 96°57'23"O	Goiaba
Mex-Apaz	Mexico: Veracruz, Apazapan, Apazapan	19°17'0"N 96°36'59"O	Armadilha McPhail
Mex-Jica	Mexico: Veracruz, E. Zapata La Jicayna	19°21'44"N 96°39'23"O	Goiaba

Figura 1. Locais de origem das amostras: 1. Uberlândia (MG); 2. Guaxupé (MG); 3. Três Rios (RJ); 4. São Luís do Paraitinga (SP); 5. Ubatuba (SP); 6. Ilhabela (SP); 7. Santa Isabel (SP); 8. Botucatu (SP); 9. Misiones, Argentina; 10. Concordia, Argentina; 11. Tucumán, Argentina; 12. Horco molle, Argentina; 13. La Molina, Peru; 14. Piura, Peru; 15. Guayaquil, Equador; 16. Tolima, Colômbia; 17. Guatemala-City, Guatemala; 18. Tapachula, México; 19. Quitana Roo, México; 20. Teocelo, México; 21. Apazapan, México; 22. Jicayna, México.

Análise do ITS1

Extração de DNA

As extrações de DNA foram realizadas seguindo o método adaptado a partir do protocolo para extração de DNA de *Drosophila* sp. “Single fly DNA extraction” (Jowett, 1986). Para cada extração foi utilizado o tórax de um indivíduo, que foram macerados em solução [Tris-HCl 10 mM (pH= 7,5), NaCl 60 mM, EDTA 50 mM], seguida da adição de solução de lise [SDS 1,25 %, Tris-HCl 0,3 M (pH = 9,0), EDTA 0,1 M, sacarose 5 %, proteinase K a 100 µg/ml.] e a mistura foi incubada a 65 °C por 1 hora. Após, o material foi incubado a 4 °C por 45 min, seguido de centrifugação a 12.000 g a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante transferido para outro tubo contendo etanol 100% com o dobro de seu volume para a precipitação do DNA. Após cinco minutos de incubação à temperatura ambiente, as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 g à temperatura ambiente. O precipitado foi seco e suspenso novamente em 20 µl de H₂O milli-Q (Millipore) para cada amostra, que foi armazenada a -20°C. As amostras de DNA recém-extraído foram tratadas com RNAase (Ribonuclease A, Sigma) a uma concentração final 100 µg/ml por 1 hora a 37 °C, para eliminar o RNA.

Amplificação do ITS1

Para a amplificação do ITS1, nos primeiros experimentos, foram utilizados os iniciadores NS15 (CAATTGGGTGTAGCTACTAC) e o ITS6 (AGCCGAGTGATCCACCGCT) que segundo Armstrong & Cameron (2000), se ancoram, respectivamente, no gene 18S e 5.8S. Para tal protocolo utilizou-se a enzima Taq polimerase (Invitrogen) com a seguinte programação no termociclador Eppendorf: 2 min a 94 °C, 31 ciclos de 30 s de desnaturação a 94 °C, 30 s de anelamento a 60 °C e 2 min alongação a 68 °C. adicionalmente, foi feita uma extensão final de 5 min a 72 °C.

Após o seqüenciamento dos fragmentos obtidos, foi verificado que o iniciador NS15 estava ancorado e, portanto amplificando, uma região do 18S muito distante do ITS1, não sendo possível o alinhamento desta seqüência com a gerada pelo iniciador ITS6. Além disso, como o iniciador ITS6 se ancorava no ITS1, não era possível obter o seqüenciamento da região final desse espaçador. Resultados semelhantes já haviam sido observados por Rocha (2005) na análise do ITS1 de *Anastrepha sororcula*. Desta forma foi necessária a construção de novos iniciadores: dois para a porção inicial do ITS1, e dois para a porção final.

A partir da seqüência AY775552, que contém a região completa do ITS1 de *A. fraterculus* s.l. e com o auxílio do programa de computador Gene Runner, foram gerados os seguintes *primers* (Figura 2):

- 18SF (forward)-(TAACTCGCATTGATTAAGTCCC): final do 18S.
- ITS1R (reverse)-(ATATGTGATGAATAAGTACAAC): início do ITS1.
- ITS1F (forward)-(GTTGAACTAAGACATTCGCAAC): final do ITS1.
- 5.8SR (reverse)-(GATATGCGTTCAAATGTCGATG): início do 5.8S.

Os fragmentos amplificados pelos novos iniciadores foram de 500 pb para o 18SF/ITS1R, 250pb para ITS1F/5.8SR (Figura 3). Uma vez detectadas as porções iniciais e terminais do ITS1, nas análises das diferentes amostras populacionais foram utilizados os iniciadores 18SF/5.8S que amplificaram fragmentos de 900 pb (Figura 4 e 8).

Eletoforese

Alíquotas do DNA foram analisadas por eletroforese em géis de agarose a 1,0% em tampão TAE. A eletroforese foi realizada em cubas horizontais contendo solução TAE 1X como tampão de corrida, por 30 minutos sob tensão elétrica de 60 V e corrente de 60 mA constantes, conforme recomendado por Sambrook *et al* (1989). Os géis foram corados com brometo de etídio a 5 µg/ml, visualizadas em um transiluminador UV com filtro vermelho. As imagens dos géis foram digitalizadas em uma câmera digital (Vilber Loumart) e transferidas para computador para análise.

Figura 2. Organização do DNA ribossômico (DNAr) em *Ceratitidis*, modificado de Douglas & Haymer (2001). Os blocos em cinza representam as regiões codificadoras, as linhas representam a região não-codificadora (ITS). Localização aproximada dos iniciadores utilizados neste trabalho. Desenho não em escala.

Figura 3: Fragmento do ITS1 de amostra de *A. sp. 1* de Santa Isabel (SP) amplificado com os iniciadores 18SF e ITS1R (1) e com os iniciadores ITS1FS e 5.8SR (2). Gel de agarose 1%. Marcador GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder.

Clonagem

Foi feita a clonagem dos fragmentos amplificados utilizando o “kit” Topo TA Cloning (Invitrogen). O protocolo consiste na amplificação do ITS1 com o aumento da extensão final por 10 min a 72°C. Em seguida, 4µl da amostra foram adicionados a 1µl de solução salina (1,2M NaCl, 0,06 M MgCl₂) e 1µl do TOPO Vector (10 ng/µl de plasmídeo em: 50% glicerol, 50mM Tris-HCl, Ph 7.4, 1mM ADTA, mM DDT, 0,1% Triton X-100, 100 µg/ml BSA, fenol), e incubada por 5 min à temperatura ambiente. Posteriormente, foram misturadas células de *Escherichia coli* (One Shot *E. coli* cells), incubadas no gelo por 15min e submetidas a choque térmico a 42 °C por 42 segundos. Posteriormente, foram adicionados 250 µl de S.O.C (2% triptona, 0,5% de extrato de levedura, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM Mg SO₄, 20mM de glicose), e incubados por 1 hora a 37 °C, quando, então, foram colocados em placas de LB-ágar (100µl ampicilina, 100µl X-gal) para crescimento das células e mantidas por doze horas a 37°C. Após crescimento das colônias, 10 de cada amostra foram separadas e analisadas por nova amplificação do ITS1. Foram feitas culturas dessas colônias em LB médio contendo 100µl de ampicilina e mantidas sob agitação a 37° C por doze horas. Posteriormente, o DNA plasmidial foi extraído pelo método de lise alcalina, seguindo-se o manual do kit “Perfectprep Plasmid Mini” (Eppendorf).

Seqüenciamento de DNA

O seqüenciamento dos fragmentos amplificados foi feito com os iniciadores 18SF e 5.8SR (que seqüenciam as extremidades 5' e 3' respectivamente) e o “kit” para seqüenciamento automático BigDye 2.0 (Applied Biosystems). Foram seqüenciados 10 clones para cada amostra, com duas réplicas para cada reação.

Em cada reação de seqüenciamento foram usados 200 ng de fragmento amplificado purificado, 2 pmol de um dos primers e 4 µl de BigDye. O programa de reações utilizado no aparelho termociclador Eppendorf foi 2 min a 94 °C, 25

ciclos de 30 s de desnaturação a 94 °C, 30 s de anelamento a 60 °C e 2 min de alongação a 68 °C.

A leitura do seqüenciamento foi feita em um aparelho de seqüenciamento automático ABI-377 (Applied Biosystems), e os eletroferogramas foram analisados pelo programa Sequence Navigator (para Macintosh), para comparação das réplicas, eliminação de erros de leitura do seqüenciamento e também para obtenção de alinhamentos entre seqüências das amostras de populações de *A. fraterculus*.

Análise Filogenética

Inicialmente as seqüências obtidas foram alinhadas utilizando o programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) para retirar as porções dos genes 18S e 5.8S.

Em seguida a análise foi feita com o programa POY (Wheeler *et al.*, 2003). Este programa, na análise filogenética de seqüências, implementa procedimentos heurísticos para obtenção de árvores mais parcimoniosas para um conjunto de dados, considerando um conjunto de parâmetros de custos de transformações. O programa usa métodos clássicos de busca heurística para gerar as árvores mais parcimoniosas, utilizando a otimização direta e encontra os alinhamentos que expliquem as topologias das árvores geradas com menor custo (De Laet & Wheeler, 2003).

Umas das vantagens do POY é a busca de todos os alinhamentos possíveis para encontrar a árvore mais parcimoniosa sem a necessidade de um pré-alinhamento (Giribet, 2001; Mascarenhas, 2007). O ClustalW, por exemplo, realiza apenas um alinhamento e, além disso, alinhamentos realizados manualmente são subjetivos, não podem ser replicados por diferentes autores (Phillips *et al.*, 2000; Wheeler, 2003; Mascarenhas, 2007).

As análises para as seqüências do ITS1 foram repetidas para oito conjuntos de parâmetros de custos de inserção de *gaps*, que variou entre 1, 2, 4 e 8, e de transições e transverções, que variaram entre 1 e 2. Foram geradas 100 réplicas para cada um dos conjuntos de parâmetros.

As árvores geradas foram analisadas segundo o método de Sokal & Rohlf (1981), pelo qual são usadas as árvores de consenso estrito, geradas a

partir do maior número de árvores igualmente parcimoniosas dentre os conjuntos de árvores obtidas para cada conjunto de parâmetros estudados. Desta forma, apenas grupos que se repetem em todas as árvores são mantidos.

As análises filogenéticas foram feitas com as seqüências das amostras do complexo *fraterculus* geradas neste trabalho e, além disso, foram utilizadas, como grupos externos, as seqüências de *A. obliqua* e *Ceratitis capitata* também geradas neste trabalho e as seguintes seqüências do GenBank: AY775552, de *A. fraterculus* s.l. de Tucumán, Argentina (Garma & Haymer, 2004); a seqüência AF307848 de *C. capitata* de amostra de Valência, Espanha e a seqüência AF189690 de *C. rosa* da África do Sul (Douglas & Haymer, 2001). Todas estas seqüências compreendem a porção final do gene 18S e inicial do gene 5.8S e a seqüência completa do ITS1. As porções dos genes 18S e 5.8S foram retiradas antes da análise filogenética.

RESULTADOS

I. Análise das Amostras de populações do Brasil

Com a finalidade de avaliar a variabilidade do ITS1, foram analisadas amostras de oito populações coletadas na região Sudeste do Brasil (Tabela I). Para cada localidade, foi feita a amplificação e seqüenciamento de 10 exemplares de adultos que emergiram no laboratório de frutos infestados coletados na natureza, representado, assim, amostras das populações naturais.

Os fragmentos amplificados com os iniciadores 18SF e 5.8S, continham, em todas essas amostras, cerca de 900pb, não havendo portanto, diferenças significativas entre eles quanto ao tamanho, como mostra a Figura 4.

Frequência de bases e índice de similaridade

Os fragmentos amplificados continham, além do ITS1, a porção final do gene 18S e a porção inicial do gene 5.8S, porções que foram retiradas para análises que se seguiram. As seqüências alinhadas de *A.sp.1*, *A. sp.2* e *A. sp.3*, estão apresentadas no Anexo I.

Na Tabela III são mostradas as frequências de bases do ITS1 das três entidades do complexo nas amostras coletadas no Brasil. Assim, tomando-se o conteúdo de AT como referência, pode-se notar que o ITS1 de *A. sp.1* e *A.sp.2* é rico em AT (cerca de 82,6%) e que não houve variação significativa entre as amostras de cada espécie, nem entre elas. Pequena diferença foi observada para *A. sp.3* com conteúdo de AT de 83,3%.

A Tabela IV mostra os índices de similaridade interespecíficas que, em *A. sp.1*, variou de 98,2% (amostra de Guaxupé e Botucatu) a 99,9% (amostra de Botucatu e Santa Isabel). Em relação a *A. sp.2*, as amostras apresentaram similaridade entre 98,0% (amostra de Ubatuba e Santa Isabel) a 99,8% (amostra de Três Rios e Santa Isabel). Já em *A. sp.3*, houve uma variação entre 98,4% (amostra de Santa Isabel e Ubatuba) a 99,5% (São Luis de Paraitinga e Ubatuba).

Figura 4: Fragmentos amplificados do ITS1 pelos primers 18SF e 5.8SR. Marcador GeneRuler™ DNA Ladder Mix. Como exemplo, temos as amostras das seguintes localidades: 1: A. sp. 1 de Santa Isabel; 2: A. sp. 1 de Botucatu; 3: A. sp. 1 de Uberlândia; 4: A. sp. 1 de Guaxupé; 5: A. sp. 2 de Ubatuba; 6: A. sp. 2 de Santa Isabel; 7: A. sp. 3 de Ubatuba e 8: A. sp. 3 de Santa Isabel.

Tabela III. Frequência de bases e tamanho do ITS1 das amostras seqüenciadas do Brasil.

Taxa	A		C		G		T		AT (%)	CG (%)	Total de Bases
	N	%	N	%	N	%	N	%			
A. sp.1-Botuc	245	44,87	55	10,07	40	7,32	206	37,72	82,600	17,39	546
A. sp.1-SIsab	244	44,68	55	10,07	40	7,32	207	37,91	82,600	17,39	546
A. sp.1-SLPar	244	44,68	55	10,07	40	7,32	207	37,91	82,600	17,39	546
A. sp.1-Trios	245	44,87	55	10,07	40	7,32	206	37,72	82,600	17,39	546
A. sp.1-Guaxu	243	44,50	55	10,07	40	7,32	208	38,09	82,600	17,39	546
A. sp.1-Uberl	245	44,87	55	10,07	40	7,32	206	37,72	82,600	17,39	546
A. sp.2-SIsab	248	45,33	51	9,32	44	8,04	204	37,29	82,632	17,36	547
A. sp.2-IBela	246	44,97	51	9,32	44	8,04	206	37,66	82,633	17,36	547
A. sp.2-Ubatu	246	44,97	51	9,32	44	8,04	206	37,66	82,633	17,36	547
A. sp.2-Trios	246	44,97	51	9,32	44	8,04	206	37,66	82,633	17,36	547
A. sp.3-SIsab	245	44,87	50	9,15	41	7,50	210	38,64	83,334	16,66	546
A. sp.3-Ubatu	244	44,68	50	9,15	41	7,50	211	38,64	83,334	16,66	546
A. sp.3-SLPar	245	44,87	50	9,15	41	7,50	210	38,64	83,334	16,66	546

Entre as espécies, como mostra a Tabela IV, a menor similaridade (0,897) foi observada entre as amostras de *A. sp.2* de Ilhabela e *A. sp.1* de Botucatu e o maior índice ocorreu entre as amostras de *A. sp.2* de Ilhabela e *A. sp.3* de Ubatuba e entre *A. sp.2* e *A. sp.3* ambas de Santa Isabel. Tomando-se a similaridade média calculada entre as amostras de cada espécie, observa-se uma similaridade de 0,902 entre *A. sp.1* e *A. sp.2*, de 0,965 entre *A. sp.1* e *A. sp.3* e de 0,981 entre *A. sp.2* e *A. sp.3*.

A espécie *A. sp.1* apresentou uma divergência muito baixa na sequência do ITS1, apenas uma base na sequência completa. Isto ocorreu em alguns casos, tanto entre os indivíduos de uma mesma população, os quais foram clonados e seqüenciados dez exemplares para cada população, quanto entre as amostras populacionais das regiões coletadas. O mesmo ocorreu para as espécies *A. sp.2* e *A. sp.3*.

Análises filogenéticas

Após o alinhamento das seqüências pelo programa ClustalW, elas foram analisadas pelo programa POY. Assim, foram obtidas muitas árvores igualmente parcimoniosas para cada um dos conjuntos de parâmetros de custo de inserção de *gaps*, de substituições dos tipos transição e transversão (Tabela V). O custo da árvore mais parcimoniosa variou de 576, para os parâmetros 1:1:1, a 2282 para os parâmetros 8:1:1. O número de réplicas com árvores de menor custo, sendo o número de réplicas total igual a 100, variou de 28 para os parâmetros 8:1:1 a 94 para os 1:2:1. O número de árvores igualmente parcimoniosas variou de 861 para os parâmetros 4:1:1 até 2526 para os parâmetros 2:1:2. De acordo com os resultados obtidos, não há relação entre o custo da árvore mais parcimoniosa, o número de réplicas com árvores de menor custo e número de árvores igualmente parcimoniosas (Tabela V), de modo similar aos resultados obtidos em outras análises (Mascarenhas, 2007).

Três topologias de árvores de consenso estrito foram geradas (Figuras 5, 6 e 7). Uma delas foi recorrente quando foram utilizados, isoladamente, seis conjuntos de parâmetros (1:1:1, 1:1:2, 1:2:1, 2:1:1, 2:1:2, 2:2:1), sendo, desta forma, a topologia com melhor suporte (Figura 5). A outra foi gerada com os parâmetros 4:1:1 (Figura 6) e a última pelos parâmetros 8:1:1 (Figura 7).

Tabela IV. Índices de similaridade do ITS1 das amostras brasileiras do complexo *A. fraterculus*.

		A. sp.1						A. sp.2				A. sp.3		
	Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	A. sp.1-Botuc	1												
2	A. sp.1-Sisab	0,999	1											
3	A. sp.1-SLPar	0,991	0,998	1										
4	A. sp.1-Trios	0,998	0,998	0,994	1									
5	A. sp.1-Guaxu	0,982	0,989	0,993	0,996	1								
6	A. sp.1-Uberl	0,990	0,995	0,994	0,991	0,991	1							
7	A. sp.2-Sisab	0,899	0,980	0,978	0,982	0,982	0,909	1						
8	A. sp.2-IBela	0,897	0,991	,0976	0,978	0,978	0,969	0,996	1					
9	A. sp.2-Ubatu	0,902	0,980	0,989	0,989	0,985	0,923	0,980	0,994	1				
10	A. sp.2-Trios	0,911	0,978	0,978	0,991	0,980	0,911	0,998	0,995	0,986	1			
11	A. sp.3-Sisab	0,954	0,974	0,993	0,976	0,991	0,915	0,980	0,976	0,998	0,978	1		
12	A. sp.3-Ubatu	0,972	0,992	0,975	0,982	0,976	0,905	0,995	0,998	0,973	0,993	0,984	1	
13	A. sp.3-SLPar	0,969	,0,994	,0,972	0,992	0,985	0,915	0,968	0,984	0,981	0,987	0,991	0,995	1

Tabela V. Custo das árvores mais parcimoniosas, número de árvores igualmente parcimoniosas e número de réplicas em que as árvores de menor custo foram obtidas para cada um dos conjuntos de parâmetros analisados para as amostras brasileiras.

Parâmetros (Gap: ts: TV)	Custo	No. de árvores	No. de réplicas
1:1:1	576	1142	87
1:1:2	534	1895	88
1:2:1	543	1235	94
2:1:1	729	2526	88
2:1:2	874	1887	89
2:2:1	859	986	83
4:1:1	1458	862	65
8:1:1	2282	1236	28

A árvore mais parcimoniosa de topologia recorrente com os seis parâmetros agrupou as amostras em três clados distintos (Figura 5). O primeiro contendo as amostras de *A. sp.1*, na qual as duas amostras de Minas Gerais (Uberlândia e Guaxupé) ficaram mais próximas entre si. Próximo a estas, ficou o clado de *A. sp.3*, e finalmente, *A. sp.2* formando o grupo mais distante.

A árvore gerada pelos parâmetros 4:1:1 (Figura 6) não conseguiu separar bem as amostras. Nela, *A. sp.3* de Ubatuba ficou próxima das amostras de *A. sp.1* e a de Santa Isabel da *A. sp.2*, formando assim apenas dois clados.

A árvore gerada pelo parâmetro 8:1:1 foi a mais discrepante, na qual apesar de separar bem as amostras de *A. sp.1*, aproximou as amostras de Santa Isabel de *A. sp.2* e de *A. sp.3* junto a *A. sp.2* de Ubatuba, separando a outra amostra de *A. sp.3* de Ubatuba (Figura 7).

Há que se notar, no entanto, que nas três árvores apresentadas, os clados gerados agrupam distintamente as três espécies do complexo, *A. sp.1*, *A. sp.2* e *A. sp.3*.

Figura 5. Árvore de consenso estrito do ITS1 do complexo *fraterculus* para as amostras do Brasil, recorrente para cada um dos conjuntos de parâmetros de custo isoladamente testados: 1:1:1, 1:1:2, 1:2:1, 2:1:1, 2:1:2 e 2:2:1.

Figura 6. Árvore de consenso estrito do ITS1 do complexo *fraterculus* para as amostras do Brasil, recorrente para cada um dos conjuntos de parâmetros de custo isoladamente testados: 4:1:1.

Figura 7. Árvore de consenso estrito do ITS1 do complexo *fraterculus* para as amostras do Brasil, recorrente para cada um dos conjuntos de parâmetros de custo isoladamente testados: 8:1:1.

II. Amostras da América Latina

As amostras coletadas em diversas regiões do México, Guatemala, Colômbia, Equador, Peru e Argentina não apresentaram diferenças no tamanho do ITS1 dos indivíduos analisados em cada amostra (Figura 8).

De cada amostra foram seqüenciados 10 indivíduos. As diferenças encontradas foram nas seqüências entre as diversas entidades coletadas ao longo da América Latina, como será mostrado a seguir.

Para comparação das espécies brasileiras do complexo com as entidades de outras regiões das Américas, foram escolhidas, como referenciais, as amostras de Ubatuba (SP) para a *A. sp.2* e *A. sp.3* e a amostra de Santa Isabel (SP), para a *A. sp.1*.

Frequência de bases e índice de similaridade

As amostras seqüenciadas de *A. sp.1*, *A. sp.2* e *A. sp.3* apresentaram o tamanho do ITS1 variando de 546 a 547 bases, como mostrado anteriormente (Tabela III). As seqüências das amostras do México e Guatemala variaram de 545, para Mex-Chis, a 561 bases, para Mex-Apaz. As amostras da Colômbia, Equador e Peru tiveram suas seqüências variando de 539 (Equad-Gua) a 573 (Col-Tol) bases. As amostras da Argentina tiveram suas seqüências entre 542 (Arg-Mis) a 584 (Arg-Conc) bases (Tabela VI).

Todos os exemplares apresentaram uma quantidade muito maior de base AT do que CG, variando de 77,84% (amostra Arg-Tucu) a 86,85% (Equad-Gua) (Tabela VI).

O índice de similaridade entre as amostras da Argentina variou de 90% (entre Arg-HMolle e Arg-Tucu) a 99,8% entre AY775552 (Tucumán) e Arg-Mis. Entre as amostras mexicanas e a da Guatemala a menor similaridade foi entre Mex-Jica e Mex-QRoo (87,4%) e a maior similaridade entre Mex-Teoc e Mex-Apaz e entre Mex-Teoc e Guat-City (99,7%). Entre as amostras da Colômbia, Equador e Peru, o maior índice de similaridade foi entre as duas amostras do Peru (99,1%) e o menor entre Col-Tol, Peru-LMol e *A. sp.4* (93,8%) (Tabela VII).

Figura 8: Fragmentos amplificados do ITS1 pelos primers 18SF e ITS6. Marcador GeneRuler™ DNA Ladder Mix; 1: *C.capitata*; 2: *A.obliqua*; 3: *A.sp1 aff. fraterculus*; 4: *A.sp2 aff. fraterculus*; 5: *A.sp3 aff. fraterculus*; 6: Equad-Gua; 7: Mex-Apaz; 8: Mex-Jica; 9: Mex-Teoc; 10: Mex-QRoo; 11: Mex-Tap; 12: Guat-City; 13: Col-Tol; 14: Peru-Lmol; 15: Peru-Piura; 16: Arg-Conc; 17: Arg-HMolle; 18: Arg-Tucu; 19: Arg-Mis.

Tabela VI. Frequência de bases e tamanho do ITS1 das amostras da América Latina.

Taxa	A		C		G		T		AT (%)	CG (%)	Total de Bases
	N	%	N	%	N	%	N	%			
A. sp.1	244	44,68	55	10,07	40	7,32	207	37,91	82,60	17,39	546
A. sp.2	246	44,97	51	9,32	44	8,04	206	37,6	82,63	17,36	547
A. sp.3	244	44,68	50	9,15	41	7,50	211	38,64	83,33	16,66	546
Equad-Gua	249	49,19	48	8,90	39	7,23	203	37,66	86,85	16,14	539
Mex-Apaz	258	45,98	50	8,91	48	8,55	205	36,54	82,53	17,46	561
Mex-Jica	245	44,22	62	11,19	59	10,6	188	33,93	78,15	21,84	554
Mex-Teoc	261	46,03	51	8,99	47	8,28	208	36,68	82,71	17,28	567
Mex-Chis	248	45,50	49	8,99	45	8,25	203	37,24	82,75	17,24	545
Mex-QRoo	245	43,82	59	10,55	62	11,09	193	34,52	78,35	21,64	559
Mex-Tap	247	44,82	53	9,61	48	8,71	203	36,84	81,67	18,33	551
Guat-City	254	45,52	50	8,96	47	8,42	207	37,09	82,61	17,38	558
Col-Tol	256	44,67	61	10,68	49	8,55	207	36,08	80,76	19,23	573
Peru-Lmol	267	47,09	53	9,34	45	7,93	202	35,62	82,71	17,28	567
Peru-Piura	266	47,16	52	9,22	42	7,44	204	36,17	83,33	16,66	564
Arg-Conc	265	45,37	60	10,27	42	7,19	217	37,15	82,53	17,46	584
Arg-HMolle	244	44,93	51	9,39	43	7,91	205	37,75	82,68	17,31	543
Arg-Tucu	237	42,70	72	12,97	51	9,18	195	35,13	77,83	22,16	555
Arg-Mis	244	45,01	50	9,22	40	7,38	208	38,37	83,39	16,60	542
AY775552	247	45,32	51	9,35	40	7,33	207	37,98	83,30	16,69	555

Tabela VII. Índice de similaridade do ITS1 entre as amostras da América Latina.

	Entidade	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	sp1	1																	
2	sp2	0,988	1																
3	sp3	0,995	0,99	1															
4	Equad-Gua	0,978	0,975	0,98	1														
5	Mex-Apaz	0,959	0,953	0,961	0,967	1													
6	Mex-Tap	0,953	0,947	0,955	0,949	0,959	1												
7	Mex-QRoo	0,921	0,919	0,923	0,928	0,946	0,92	1											
8	Mex-Jica	0,932	0,922	0,926	0,916	0,924	0,934	0,874	1										
9	Mex-Teoc	0,973	0,957	0,964	0,967	0,997	0,962	0,949	0,928	1									
10	Guat-City	0,959	0,953	0,96	0,964	0,994	0,958	0,946	0,924	0,997	1								
11	Col-Tol	0,936	0,927	0,93	0,938	0,93	0,922	0,886	0,908	0,934	0,93	1							
12	Peru-LMol	0,978	0,976	0,977	0,987	0,957	0,945	0,975	0,916	0,96	0,957	0,938	1						
13	Peru-Piura	0,982	0,98	0,983	0,99	0,964	0,953	0,927	0,92	0,968	0,964	0,941	0,991	1					
14	Arg-Miss	0,997	0,992	0,998	0,982	0,967	0,956	0,925	0,928	0,966	0,962	0,932	0,978	0,985	1				
15	Arg-Conc	0,997	0,988	0,995	0,978	0,959	0,953	0,921	0,928	0,963	0,959	0,932	0,975	0,982	0,997	1			
16	Arg-HMolle	0,99	0,985	0,992	0,975	0,955	0,949	0,919	0,92	0,959	0,955	0,924	0,972	0,978	0,994	0,9	1		
17	Arg-Tuc	0,929	0,919	0,927	0,912	0,895	0,897	0,863	0,88	0,89	0,895	0,881	0,914	0,912	0,919	0,925	0,921	1	
18	AY775552	0,998	0,99	0,993	0,98	0,961	0,954	0,923	0,93	0,974	0,93	0,934	0,98	0,984	0,998	0,995	0,992	0,931	1

Análises filogenéticas

Foram obtidas muitas árvores igualmente parcimoniosas para cada um dos conjuntos de parâmetros de custo de inserção de *gaps* e de substituição do tipo transição e transversão (Tabela VIII). O custo da árvore mais parcimoniosa variou de 423, para os parâmetros 1:1:1, a 2181, para os parâmetros 8:1:1. O número de réplicas com árvores de menor custo, sendo o número de réplicas total igual a 100, variou de 36 para os parâmetros 8:1:1 a 92 para os 1:2:1. O número de árvores igualmente parcimoniosas variou de 609 para os parâmetros 4:1:1 até 2558 para os 2:1:2. Assim como ocorrido para as amostras do Brasil, não há relação entre o custo da árvore mais parcimoniosa, o número de réplicas com árvores de menor custo e número de árvores igualmente parcimoniosas (Tabela VIII).

Assim como ocorreu para as amostras brasileiras, três topologias de árvores de consenso estrito foram geradas (Figuras 9, 10 e 11). Uma delas foi gerada quando foram utilizados, isoladamente, seis conjuntos de parâmetros (1:1:1, 1:1:2, 1:2:1, 2:1:1, 2:1:2, 2:2:1), sendo, desta forma, a topologia com melhor suporte (Figura 9). A outra foi gerada com os parâmetros 4:1:1 (Figura 10) e a última pelos parâmetros 8:1:1 (Figura 11).

A árvore mais parcimoniosa agrupou as amostras em clados distintos (Figura 9). O grupo formado por *C. capitata* e *C. rosa* foi colocado em um ramo distinto e no outro agrupamento, todas as amostras de *Anastrepha*. Neste clado, *A. obliqua* separou-se de outro grupo que continha todas as amostras de *A. fraterculus*.

O clado de *A. fraterculus*, separou as amostras do México e Guatemala das demais, que formaram outro clado. Dentro deste clado, foram formados três subgrupos, um com as amostras do Peru e Equador, um com as amostras do Brasil e Argentina e outro com a amostra da Colômbia. O subgrupo do Equador e Peru se mostrou mais próximo ao do Brasil e Argentina do que o da Colômbia.

A Figura 9 mostra que no clado contendo as amostras da Argentina e do Brasil, houve um primeiro agrupamento separando a amostra Arg-Conc das demais. Dentre estas, *A. sp.2* isolou-se em um subgrupo distinto do agrupamento das demais amostras. Neste subgrupo, a amostra retirada do

GenBank AY775552 (Argentina, Tucumán) separou-se das demais que formaram um agrupamento bem distinto: *A. sp.1* (Brasil) ficou mais próxima da amostra Arg-Tucu e a *A. sp.3* (Brasil) mais próxima das amostras Arg-Mis e Arg-Molle.

O segundo clado continha as amostras do Peru (LMol e Piura) e a do Equador (Gua- *A. sp.4*).

Entre as amostras mexicanas, Mex-Tap se mostrou mais próxima da Mex-Jica, Mex-QRoo ficou próxima a estas, assim como a amostras da Guatemala (Guat-City). Mex-Apaz ficou próxima e este subgrupo e Mex-Teoc se mostrou o subgrupo mais distante.

A árvore gerada pelos parâmetros 4:1:1 (Figura 10) não conseguiu separar bem as amostras do Brasil e Argentina, assim como as amostras do Peru, Colômbia e Equador e juntou estas a *A. obliqua*. Porém, separou bem as amostras do México, juntando Mex-Apaz e Guat-City, Mex-QRoo e Mex-Jica. sendo mais distantes Mex-Teoc e Mex-Tap.

A árvore gerada pelo parâmetro 8:1:1 foi a mais discrepante, na qual não separou bem as amostras e ainda aproximou Mex-QRoo das seqüências do Brasil e Argentina, além de aproximar Equad-Gua destas. Como na árvore anterior, aproximou as amostras do Peru de *A. obliqua* (Figura 11).

Tabela VIII. Custo das árvores mais parcimoniosas, número de árvores igualmente parcimoniosas e número de réplicas em que as árvores de menor custo foram obtidas para cada um dos conjuntos de parâmetros analisados para a América Latina e Brasil.

Parâmetros (Gap: ts: TV)	Custo	No. de árvores	No. de réplicas
1:1:1	423	1442	82
1:1:2	659	1540	84
1:2:1	748	1181	92
2:1:1	874	2312	78
2:1:2	959	2558	82
2:2:1	742	1096	84
4:1:1	1351	609	54
8:1:1	2181	1128	36

Figura 9. Árvore de consenso estrito do ITS1 do complexo *fraterculus* para as amostras da America Latina, recorrente para cada um dos conjuntos de parâmetros de custo isoladamente testados: 1:1:1, 1:1:2, 1:2:1, 2:1:1, 2:1:2 e 2:2:1.

Figura 10. Árvore de consenso estrito do ITS1 do complexo *fraterculus* para as amostras da América Latina, recorrente para cada um dos conjuntos de parâmetros de custo isoladamente testados: 4:1:1.

Figura 11. Árvore de consenso estrito do ITS1 do complexo *fraterculus* para as amostras da América Latina, recorrente para cada um dos conjuntos de parâmetros de custo isoladamente testados: 8:1:1.

DISCUSSÃO

O ITS1 mostrou ser um marcador bastante útil para análises e caracterizações de espécies próximas (ref.citadas Introdução). As seqüências dos espaçadores do DNAr têm sido usadas para desenvolver *primers* e sondas espécie-específicos, particularmente para a identificação de espécies crípticas de insetos e também para identificação específica em estágios imaturos, os quais são difíceis de resolver utilizando ferramentas morfológicas tradicionais (Fritz *et al.*, 2004, Fritz, 2006). Em moscas-das-frutas, a identificação da espécie é feita somente por análise do estágio adulto, mas há grande interesse para que a identificação possa ser feita utilizando-se exemplares em seus estágios imaturos. Dentre os marcadores existentes, o ITS tem sido proposto como uma ferramenta mais acurada e eficiente na identificação das espécies (Armstrong & Cameron, 2000; Fritz, 2006). Por exemplo, na Nova Zelândia essa técnica tem sido utilizada para identificar infestações em frutas que chegam à alfândega (Armstrong & Cameron, 2000).

Armstrong & Cameron (2000) ao utilizar o iniciador ITS6 (*primer* universal, segundo as autoras) para amplificação do ITS1, afirmam que ele se ancora no gene ribossômico 5.8S em várias espécies de moscas-das-frutas, inclusive em espécie de *Anastrepha*. No entanto, no presente trabalho, foi mostrado que esse *primer* ancora-se, na realidade, no ITS1. Tal resultado foi semelhante ao encontrado por Rocha (2005) ao seqüenciar o ITS1 de *Anastrepha sororcula* com o *primer* desenhado pelas autoras. Desta forma, foi construído um novo iniciador, o 5.8SR, que realmente se ancora nesse gene.

O tamanho do espaçador é pouco variável nas amostras seqüenciadas de *A. fraterculus* s.l., sejam elas dos três morfotipos existentes no Brasil, sejam das amostras de outras regiões da América Latina. Assim, não é possível, então, a distinção entre as diferentes entidades biológicas baseadas somente no tamanho do fragmento amplificado. Desta forma, a interpretação de Basso *et al.* (2003) de que na Argentina existe apenas uma entidade de *A. fraterculus*, baseando-se no tamanho similar do fragmento amplificado (apesar de encontrarem polimorfismo nos cromossomos sexuais) precisaria ser revista. Além disso, entre as amostras analisadas no presente trabalho, mesmo aquela da espécie *A. obliqua* apresentou o ITS1 de tamanho similar. Para que se

possa fazer uma distinção interespecífica dos morfotipos do complexo *fraterculus* seria necessário a construção de iniciadores espécie-específicos dentro do ITS1 para gerar fragmentos distintos entre as espécies, como feito, por exemplo, para espécies de *Anopheles* (Fritz *et al.*, 2004). Todavia, assim como os resultados de Armstrong & Cameron (2000), o tamanho do fragmento amplificado do ITS1 distinguiu amostras de *Anastrepha* de *Ceratitis*.

A maior frequência de bases AT no ITS1 nas amostras do complexo *fraterculus* estudadas, é semelhante à encontrada por Tautz *et al.* (1988) e Schlötterer *et al.* (1994) nesse espaçador de diversas espécies de *Drosophila*, e ligeiramente mais alta que a observada para o ITS1 de *C. capitata* (78,76%) (Douglas & Haymer, 2001). Segundo Tautz *et al.* (1988), esta alta concentração de bases AT seria decorrente de drásticas alterações na composição das bases na estrutura secundária do RNAr e coevolução de mutações compensatórias. Segundo Kimura (1985) e Poon & Chao (2005), este tipo de mutação ocorre quando há redução no valor adaptativo do indivíduo causada por uma mutação, que é compensada por uma segunda mutação num outro lugar no genoma. Além disso, segundo Schlötterer *et al.* (1994), a alta concentração de bases AT estaria relacionada ao fato dos genes de DNAr estarem localizados na heterocromatina em geral rica em AT. De modo similar, Goday *et al.* (2006), mostraram que em oito espécies de *Anastrepha*, incluindo quatro do complexo *fraterculus*, os genes ribossômicos também estão localizados em blocos heterocromáticos ricos em AT.

O alinhamento das seqüências do ITS1 das diferentes amostras revelou grandes extensões de seqüências similares interrompidas por uma base ou por seqüências de poucas bases divergentes (Anexo I), resultado semelhante ao encontrado por Douglas & Haymer (2001) para espécies de *Ceratitis*. Desta forma, o índice de similaridade entre as amostras foi alto, acima de 88% entre as amostras de *A. fraterculus* e valores similares foram observados entre as amostras de *Ceratitis*. Este nível de similaridade é consistente com hipóteses que indicam uma divergência recente entre as espécies do complexo *fraterculus* (Selivon *et al.*, 2005; Smith-Caldas, 2001).

As seqüências do ITS1 de qualquer uma das amostras de *A. fraterculus* não puderam ser devidamente alinhadas às de *Ceratitis* devido à baixa similaridade. Como previsto, a comparação do ITS envolvendo espécies mais

distantes mostram mudanças maiores e refletem em menores similaridades (Armstrong *et al.*, 1997; Douglas & Haymer, 2001). Isto está relacionado ao fato de que regiões não codificadoras como o ITS1 toleram e tendem a acumular mutações ao contrário do que ocorre com as regiões codificadoras (Haymer, 1994). Embora restrições sobre a evolução de algumas porções das seqüências dos espaçadores tenham sido sugeridas, como a possibilidade do envolvimento do ITS na formação final do RNAr (van Nues *et al.*, 1994; Douglas & Haymer, 2001) e na formação da estrutura secundária (Wesson, *et al.*, 1992; Douglas & Haymer, 2001), ainda não há evidência de conservação de seqüências específicas nesta região. Os resultados obtidos com o ITS1 do complexo *fraterculus*, mostram que as extremidades 5' e 3' do espaçador, respectivamente regiões de contato com os genes codificadores 18S e 5.8S, são conservadas.

Em nível intra-específico, envolvendo comparações entre indivíduos ou populações dentro da espécie, a seqüência do ITS tende a ser extremamente similar (Douglas & Haymer, 2001). Os resultados obtidos para as amostras coletadas em diversas localidades do Brasil para *A. sp.1*, *A. sp.2* e *A. sp.3* estão de acordo com essas observações. Isto seria resultado de um direcionamento molecular ("*molecular drive*") ou outras forças agindo para homogeneizar estas seqüências dentro das espécies (Elder & Tuner, 1995; Douglas & Haymer, 2001).

Sendo o polimorfismo intraespecífico praticamente inexistente e a heterogeneidade entre as amostras de diferentes regiões significativas, a seqüência do ITS1 pode ser utilizada para comparações filogenéticas entre as amostras do complexo *fraterculus*. A análise filogenética através do programa POY (Wheeler, 2003) gerou árvores parcimoniosas que se mostraram bastante robustas.

Entre as espécies que ocorrem no Brasil, a análise agrupou as amostras populacionais em três clados, cada um congregando amostras de apenas uma das espécies, um clado para *A. sp.1*, um para *A. sp.2* e outro para *A. sp.3*, apesar de haver pequenas diferenças entre as amostras populacionais de cada espécie. Níveis baixos de heterogeneidade entre as populações de *A. sp.1* e *A. sp.2* já haviam sido observadas para outras características biológicas, como isozimas e dados morfométricos (Selivon *et al.*, 2005).

Quando a análise foi estendida para as amostras da América Latina, a árvore mais consensual, segundo os diferentes parâmetros, agrupou as entidades em quatro clados distintos: um para o Brasil/Argentina, um para o Equador/Peru, um para o México/Guatemala e outro para a amostra da Colômbia. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Hernandez-Ortiz *et al.* (2004) através de análises morfométricas de asas e acúleo para diversas amostras do complexo *fraterculus* coletadas no México, Argentina, Brasil e Colômbia, pelos quais propuseram um grupo Mexicano, um Andino (Colômbia) e um Brasileiro, que englobaria, também, a amostra da Argentina. Sugeriram ainda, que no grupo mexicano haveria um único morfotipo, outro na Colômbia e um no Brasil e Argentina. Entretanto, em revisão recente dos resultados da morfometria, Hernández-Ortiz (comunicação pessoal) considerou a existência de diferentes entidades dentro desses grupos e que são coerentes com nossas análises.

Excetuando-se as quatro entidades já caracterizadas pela análise de outras características biológicas, *A. sp.1*, *A. sp.2*, *A. sp.3* no Brasil e *A. sp.4* (amostra de Guayaquil, Equador), a heterogeneidade entre as amostras de cada grupo (clado), sugerem a existência de outras espécies no complexo.

No clado das amostras do México e Guatemala, as amostras de Tapachula e Jicayna estão bem próximas e junto à Quitana Roo. A amostra da Guatemala ficou próxima a estas. A amostra de Apazapan forma um ramo junto a estas quatro amostras e Teocelo foi colocada em ramo mais distante.

As amostras do Equador e as do Peru apresentam pouca divergência e, portanto, no situadas no mesmo clado. Deve-se salientar, no entanto, que a amostra de La Molina (Peru) é originária de uma colônia de laboratório e, portanto, não pode ser comparada diretamente com as outras duas amostras desse clado, Piura (Peru) e Guayaquil (Equador), que são de populações naturais.

Finalmente, o último clado agrupou as amostras do Brasil e da Argentina. Nele, a amostra de Concórdia (Argentina) ficou afastado das demais e *A. sp.2* (Brasil) isolou-se em um subgrupo distinto do agrupamento das demais amostras. Neste subgrupo, a amostra AY775552 (Argentina, Tucumán) separou-se das demais que formaram um clado bem distinto: *A. sp.1* (Brasil)

ficou mais próxima da amostra Tucumán (Argentina) e a *A. sp.3* (Brasil) mais próxima das amostras de Misiones e Horco Molle (Argentina).

No Brasil, as três entidades do complexo, *A. sp.1*, *A. sp.2* e *A. sp.3*, estão bem caracterizadas pelos diversos estudos feitos por Selivon e colaboradores utilizando análises de isozimas, morfometria de ovos, cruzamentos e dos cariótipos (Selivon *et al.*, 1999, 2004a, 2005; Selivon & Perondini, 1998; Goday *et al.*, 2006) e do DNA altamente repetitivo (Rocha & Selivon, 2004). O presente estudo do ITS1, separando esses morfotipos em três clados distintos, dá suporte adicional para que sejam consideradas como três espécies distintas, além da entidade do Equador, já descrita anteriormente por Selivon *et al.* (2004b) ao utilizar morfologia de asas, mesoesquito, ovos e cariótipo.

Baseando-se nesses resultados de análises das entidades brasileiras do complexo, pode-se admitir que o nível de diferenças observadas no ITS1 deva refletir a existência de diferentes espécies dentro do complexo *fraterculus*. Assim sendo, níveis similares de divergência filogenéticas entre as amostras devem, também, refletir a existência de diferentes entidades do complexo.

Desta forma, o presente trabalho sugere que possam existir até três entidades no México, a de Teocelo (Mex-Teoc), a de Apazapan (Mex-Apaz) e outra para Tapachula, Jicaya e Quitana Rôo (Mex-Tap, Mex-Jica e Mex-QRoo), além de uma entidade na Guatemala (Guat-City).

Assim, seguindo a sugestão feita para o clado anterior, as amostras do Peru (Peru-LMol e Peru-Piura) seriam de uma entidade e a amostra do Equador (*A. sp.4*) (Selivon *et al.*, 2004b) seria outra.

A única amostra da Colômbia, em subgrupo distinto dentro da árvore, representaria uma entidade diferente das demais.

No clado do Brasil/Argentina, além das três espécies brasileiras, na Argentina poderiam existir quatro entidades, a de Concórdia (Arg-Conc), a do AY775552 (Argentina, Tucumán), a de Misiones/ Horco Molle (Arg-Mis e Arg-HMolle) e a de Tucumán (Arg-Tucu).

Desta forma, baseado nas seqüências do ITS1 das amostras estudadas até o momento, poderia existir mais de dez espécies no complexo *Anastrepha fraterculus*. É necessário, no entanto, que outras características biológicas das amostras de outras regiões da América Latina sejam analisadas, de modo

similar às entidades brasileiras, para que os diferentes táxons do complexo possam ser devidamente caracterizados.

A existência dessas diferentes entidades dentro do complexo certamente está relacionada com a área de dimensões continentais que ocupam, refletindo assim, divergências microgeográficas para cada uma, possivelmente influenciadas por diferentes pressões ecológicas e biogeográficas (Hernandez-Ortiz *et al.*, 2004). Realmente, considerando-se as localidades de origem das amostras analisadas neste trabalho com diferentes aspectos biogeográficos sobre um mapa da biogeografia da entomofauna da América Latina proposto por Morrone (2006), pode-se observar uma grande concordância entre os dados (Figura 12).

A biogeografia da entomofauna da América Latina pode ser dividida, segundo Morrone (2006), em grandes Regiões e Zonas de Transição, as quais englobam Sub-regiões, que podem se dividir em Domínios e estes, por sua vez, em Províncias. A Região Neártica, que corresponde a América do Norte, exceto sul da Flórida, e norte do México; Zona de Transição Mexicana, que inclui o sudoeste dos Estados Unidos, México e grande parte da América Central; a Região Neotropical a qual compreende aos trópicos do Novo Mundo, isto é, maior parte da América do Sul, América Central, sul do México, Ilhas do Caribe e sul da Flórida. Esta região não inclui a porção Andina da América do Sul que corresponde a Zona de Transição da América do Sul.

A Região Neotropical se encontra subdividida em quatro grandes sub-regiões: Caribenha, Amazônica, do Paraná e do Chaco (Morrone, 2006). A sub-região Caribenha se estende do sul do México, América Central, as Antilhas e noroeste da América do Sul. Esta sub-região inclui três domínios: o Mesoamericano, que se estende desde as terras baixas do golfo do México e costa do Oceano Pacífico até o oeste do istmo do Panamá; o domínio Antilhano, que se estende pelas ilhas caribenhas. E o domínio Noroeste da América do Sul, que inclui o Panamá, Venezuela, região norte e oeste da Colômbia e parte do Equador (Morrone, 2006; Hernandez-Ortiz, 2007).

A sub-região Amazônica, a maior da região Neotropical, se estende desde as Guianas, Suriname, parte do Peru, Bolívia e Norte e Centro do Brasil; a sub-região do Chaco ocupa o nordeste e centro da Argentina, noroeste e sul

do Brasil, Paraguai e Uruguai; e a sub-região do Paraná, ocupa o sudeste e costa atlântica do Brasil.

A região Andina se estende desde a Patagônia, Chile, sul e leste da Colômbia, parte do Equador, parte d.a Venezuela (Figura 9) (Morrone, 2006; Hernandez-Ortiz, 2007).

A Tabela IX relaciona os locais de origem das amostras estudadas no presente trabalho com as divisões biogeográficas da entomofauna da América Latina. Pode-se notar que, de modo geral, existe uma concordância entre os grupos (clados) e as sub-regiões e mesmo entre alguns dos domínios. Por exemplo, todas as amostras do clado do México/Guatemala estão na sub-região Caribenha, domínios Mesoamericano e Antilhano. Já as amostras do clado do Peru/Equador, estão localizadas também na sub-região Caribenha, mas no domínio Noroeste da América do Sul. A amostra da Colombia situa-se na Zona de Transição da América do Sul.

Entretanto, no clado Brasil/Argentina parece não haver relação entre o local de origem das amostras e as divisões biogeográficas da entomofauna. Por exemplo, as amostras da Argentina estão localizadas na Sub-região do Chaco, enquanto que as amostras do Brasil pertencem à Sub-região Paranaense. No entanto, na árvore filogenética as amostras de *A. sp.1* e *A. sp.3* (Brasil) estão agrupadas em sub-clados junto com amostras da Argentina. Uma possível interpretação é a de que os morfotipos *A.sp.1* e *A. sp.3* também existam em algumas províncias da Argentina. Anteriormente, Selivon *et al.* (2005), baseando-se em dados sobre os cariótipos, sugeriram que a entidade da Argentina estudada por Basso et al. (2003), poderia corresponder à *A. sp.1* do Brasil. Deve-se notar que nesse clado Brasil/Argentina, há concordância entre as Sub-regiões e Províncias de origem das entidades *A. sp.2* (Brasil) e a amostra de Concordia (Argentina) com os subgrupos independentes em que foram colocadas na árvore filogenética.

Entretanto, as correlações de características morfológicas e geográficas regionais, evidentemente, não são definitivas, pois representam um conjunto de hipóteses delimitando componentes bióticos e suas inter-relações, podendo ser modificadas as delimitações das regiões, sub-regiões e domínios em estudos posteriores (Morrone, 2006). Os resultados desta análise do ITS1 em

entidades do complexo *Anastrepha fraterculus* concordando, pelo menos em parte, com divisões biogeográficas da entomofauna (Morrone 2006), indicam que possam ser utilizados como indicadores de zonas a serem detalhadamente amostradas onde podem estar presentes entidades biologicamente distintas.

Tabela IX. Dados parciais extraídos de Morrone (2005) apontando as divisões da entomofauna da América Latina de onde amostras foram analisadas no presente trabalho.

Região/Zonas de Transição	Sub-região	Domínio	Província	Amostras
Neotropical	Caribenha	Mesoamericano	Golfo do México	Mexico: Teo (15); Apaz (16); Jica (17)
		Antilhano	Chiapas	Mexico: Tap (13) Gautemala:Guat-City (12)
			Península de Yucatán	Mexico: QRoo (14);
		Noroeste da America do Sul	Oeste do Equador	Equador: Gua (A. sp.4)(10)
			Tumbas-Piura	Peru: Piura (9)
	do Chaco	-----	Chaco	Argentina: HMolle (7); Tuc (6)
			Pampa	Argentina: Conc (5); Mis (4)
	Paranaense	-----	Floresta Atlântica	Brasil: sp.2; sp.3 (2/3)
			Floresta do Paraná	Brasil: sp.1 (1)
Zona de Transição da América do Sul	-----	-----	Norte dos Andes	Colômbia: Tol (11)

Figura 12. Mapa do continente americano mostrando as principais regiões biogeográficas da América Latina e Caribe. I. Região Neártica; II. Sub-região do Caribe; III. Região Andina; IV. Zona de Transição Sulamericana; V. Subregião Amazônica; VI. Subregião do Chaco; VII. Subregião Paranaense. (1). *A. sp. 1*; (2). *A. sp. 2*; (3). *A. sp. 3*; (4). Arg-Mis; (5). Arg-Conc; (6). Arg-Tucu; (7). Arg-HMolle; (8). Peru-LMol; (9). Peru-Piura; (10). Equad-Gua (*A. sp. 4*); (11). Col-Tol; (12). Guat-City; (13). Mex-Tap; (14). Mex-QRoo; (15). Mex-Teoc; (16). Mex-Apaz e (17) Mex-Jica. (modificado de Ortiz, 2007).

CONCLUSÕES

- O iniciador universal ITS6 (Armstrong & Cameron) não se ancora no gene 5.8S de espécies de *Anastrepha*;
- Os fragmentos amplificados com os iniciadores 18SF e 5.8S continham cerca de 900pb, não havendo portanto, diferenças significativas entre eles quanto ao tamanho;
- O ITS1 das amostras analisadas do complexo *fraterculus* é muito rico em bases AT;
- O tamanho do ITS1 variou entre as diferentes amostras da América Latina, mas é praticamente homogêneo entre as amostras do Brasil;
- As amostras brasileiras apresentaram similaridade acima de 90% entre si, sendo que *A. sp.1* apresentou menor similaridade com *A. sp.2* e esta maior similaridade com *A. sp.3*;
- Não foram observadas diferenças significativas entre as amostras populacionais de cada espécie no Brasil;
- A árvore mais consensual agrupou as amostras do Brasil em três clados distintos: um contendo as amostras de *A. sp.1*, outro contendo as amostras de *A. sp.3* e um grupo mais distante contendo as amostras de *A. sp.2*;
- Existe heterogeneidade entre as seqüências do ITS1 das amostras de outras regiões da América Latina;
- A árvore filogenética mais parcimoniosa gerou clados distintos, que agrupam, em geral, as amostras de acordo com sua região de origem;
- Em cada clado (exceto o da Colômbia que contém uma única amostra) existem subdivisões separando as diferentes amostras de cada região;
- Com algumas exceções, foi observada certa relação entre os agrupamentos das amostras com as divisões biogeográficas da entomofauna da América Latina proposta por Morrone (2006);
- Os dados da análise do ITS1 corroboram resultados anteriores indicando que existem três espécies do complexo *fraterculus* no Brasil (*A. sp.1*, *A. sp.2*, *A. sp.3*) e uma em Guayaquil (Equador) (*A. sp.4*);

- A heterogeneidade das seqüências do ITS1 das outras amostras da América Latina indicam que nas demais regiões geográficas possam existir outras espécies nesse complexo.

RESUMO

As espécies de moscas-das-frutas da família Tephritidae são consideradas importantes pragas da fruticultura mundial por utilizarem vários frutos de valor comercial como substrato para desenvolvimento do seu estágio de larva. O gênero *Anastrepha* é endêmico do Continente Americano e compreende cerca de 200 espécies descritas, das quais 99 ocorrem no Brasil. Dentre essas espécies, destaca-se a espécie nominal *Anastrepha fraterculus* (*sensu lato*), que compreende um complexo de espécies crípticas, quatro das quais foram reconhecidas, até o momento, *A. sp.1*, *A. sp.2* e *A. sp.3* (Brasil) e *A. sp.4* encontrada no Equador. O presente trabalho buscou a caracterização da variabilidade do espaçador ITS1 do DNA ribossômico de *A. sp.1*, *A. sp.2* e *A. sp.3* em amostras populacionais de diversas localidades do Brasil e a análise desse espaçador em amostras de outras regiões das Américas do Sul, Central e México. O ITS1 mostrou ser um marcador bastante útil para análises filogenéticas entre espécies próximas. Os fragmentos amplificados com os iniciadores 18SF e 5.8SR, construídos neste trabalho, continham cerca de 900 pb, não havendo diferenças significativas entre as amostras. Os fragmentos continham uma seqüência parcial do gene 18S, o ITS1 completo e o início do gene 5.8S. O ITS1 variou de 539 a 584 bases. Todos os exemplares apresentaram uma quantidade muito maior de base AT (entre 77,6 a 88,6%). O índice de similaridade entre as amostras variou de 88% a 99,8%. Não foram observadas diferenças significativas intraespecíficas entre as seqüências de amostras populacionais das entidades brasileiras do complexo. A análise filogenética feita pelo programa POY gerou muitas árvores igualmente parcimoniosas. A árvore de consenso estrito agrupou as amostras em clados distintos. O clado (grupo externo) formado por *C. capitata* e *C. rosa* foi colocado em um ramo distinto e no outro clado, todas as amostras de *Anastrepha*. O clado de *A. fraterculus*, separou as amostras do México e Guatemala das demais, que formaram outro clado. Dentro deste clado, foram formados dois subgrupos, um com as amostras do Peru e Equador e um com as amostras do Brasil e Argentina. Dentro desses clados houve separação em sub-grupos de amostras de cada região geográfica, sendo observada, com algumas exceções uma relação desses grupos com as divisões biogeográficas da entomofauna da América Latina. Desta forma, a análise do ITS1 corrobora resultados anteriores indicando que há claramente três entidades do complexo *fraterculus* no Brasil (*A. sp.1*, *A. sp.2* e *A. sp.3*) e que diferentes morfotipos devem existir nas diferentes regiões da América Latina.

SUMMARY

Fruit flies of Tephritidae family are important pest for the worldwide fruitculture because many species use commercial variety of fruits as host for the development of thier larval stage. *Anastrepha* is endemic of the American Continent and comprises about 200 described species, 90 of which occurs in Brazil. Among these species the most important is the nominal *A. fraterculus*, that, actually, comprises a complex of cryptic species, the so-called "*fraterculus* complex". Four species of the complex has been characterized, three of which occurs in Brazil (*A.sp.1*, *A.sp.2*, *A. sp.3*) and one in Ecuador (*A. sp.4*). In the present analyses the ITS1 spacer of the ribosomal genes was characterized by PCR and sequencing, in samples of *A. fraterculus s.l.* from several populations in Brazil and from different regions of South, Central America and Mexico. Amplyfication was carried out with primers designed in the present analyses, 18SF and 5.8SR, that generate fragments of 900 bp containing a partial sequence of the 18S gene, the complete ITS1 and the initial portion of the 5.8S gene. The length of the fragment did not varied significantly among the samples. The ITS1 size varied from 539 to 584 bp, and contained a very high content of AT, from 77.6 to 88.6 %, among samples. Similarity of the ITS1 sequences was high (from 88% to 99.8%) among the samples, and no significant intraspecific differences were found in the sequences of samples from different brazilian populations. The POY software produced many parcimonious phylogenetic trees, and the strict consensus tree grouped the samples in distinct clades. First, there was a separation of the clade of *Ceratitidis* species (outgroups) from the clade of *Anastrepha*. Within this clade *A. obliqua* was isolated from a large clade containg all the samples of *A. fraterculus s.l.*. Within *A. fraterculus*, one clade grouped the samples from Mexico and Guatemala, another clade the samples from Ecuador and Peru and a clade with the samples from Brazil and Argentina. The sample of Colombbia was found as independent branch of the tree. In each of these clades there were subgroups of the different samples, and it was observed a relationship of these clades and subgroups to the biogeographic divisions of the entomofauna of Latin America with a few exceptions. The analysis of ITS1 clearly corroborate previous data indicating that there are three biological entities of the *fraterculus* complex in Brazil. It also indicates that different entities must exist in other regions of Latin America.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberti, A. C., G. Calcagno, B. O. Daidman, and J. C. Vilardi. Analysis of the genetic structure of a natural population of *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**. v.92, p.731-736, 1999.
- Alberti AC; Rodriguero MS; Cendra PG; Saidman BO; Vilardi JC. Evidence indicating that argentine populations of *Anastrepha fraterculus* (Díptera: Tephritidae) belong to a single biological species. **Annals of the Entomological Society of America**. v.95, p.505-512, 2002.
- Aluja, M. Bionomics and management of *Anastrepha*. **Annual Review of Entomology**. v.39, p.155-178, 1994.
- Álvarez, I. and Wendel, J.R. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.29, p.417-434, 2003.
- Amaral, P.M. **Estudo da variabilidade isozímica de sete locos em larvas de populações naturais de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae)**. 74p. Tese de Doutorado, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 1994.
- Armstrong, K. F., C. M. Cameron, and E. R. Frampton. Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) species identification: a rapid molecular diagnostic technique for quarantine application. **Bulletin of entomological research**. v.87 p.111-118, 1997.
- Armstrong, K. F.; Cameron, C. M. Species Identification of Tephritids Across a Broad Taxonomic Range Using Ribosomal DNA. **Area-Wide Control of Fruit Flies and Other Insect Pests**, ed. K.H. Tan. Penerbit Universiti Sains Malaysia, Penang. P. 703-710, 2000.
- Arnheim, N. Concerted evolution in multigene families. In Nei, M. and Koehn, R. (eds), **Evolution of genes and Proteins**, Sinauer, Sunderland, MA, p. 38-61, 1983.
- Baker, A.C.; Stone, W.E.; Plummer, C.C.; MacPhail, H. A review of studies on the mexican fruit fly and related mexican species. **United States Dept. Agric. Miscellaneous Publication**, v. 531, p. 1-155, 1944.

- Barr, N. B.; Cui, L.; McPherson, B.A. Molecular Systematics of Nuclear Gene *period* in genus *Anastrepha* (Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of América**. v.98, n.2, p.173 – 180, 2005.
- Basso A, Sonvico A, Quesada-Allue LA, Manso F. Karyotypic and molecular identification of laboratory stocks of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wied) (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**. v.96(4), p.1237-44, 2003.
- Bush, G.L. The cytotaxonomy of the larvae of some Mexican fruit flies in the genus *Anastrepha* (Tephritidae: Diptera). **Psyche** v.6, p.87-101, 1962.
- Coleman, A. W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. **Trends in Genetics**. v.19, No.7, p.370-375, 2003.
- Coleman, A.W. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. **Nucleic Acids Research**. v.35, n.10, p.3322-3329, 2007.
- De Laet, J.; Wheeler, W. Poy version 3.0.11 (Wheeler, Gladstein and De Laet, May, 6 2003). Command line documentation, 2003.
- Douglas, L.J.; Haymer, D.S. Ribosomal ITS1 Polymorphisms in *Ceratitis capitata* and *Ceratitis rosa* (Diptera: Tephritidae). **Entomological Society of America**. v.94(5), p.726-731, 2001.
- Dover, G . A. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. **Nature** v.299, p.111-117, 1982.
- Dover, G. A. Molecular drive in multigene families; how biological novelties arise, spread and are assimilated. **Trends in Genetics**. v.2, p.159-165, 1986.
- Elder, J. F., Jr., and B. J. Turner. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in Eukaryotes. **The Quarterly Review of Biology**. v.70, p.297-320, 1995.
- Fenton, B.; Malloch, G.; Moxey, E. Analysis of eriophyid mite rDNA internal transcribed spacer sequences reveals variable simple sequence repeats. **Insect Molecular Biology**. v.6(1), p.23-32, 1997.
- Flavell, R. B.; M. O'Dell. The genetic control of nucleolus formation in wheat. **Chromosoma**. v.71, p.135-152, 1979.
- Fritz, A.H. Sequence Analysis of Nuclear rDNA of *Anastrepha suspensa*. **Entomological Society of America**. v.99(2), p.369-373, 2006.

- Fritz, G.N.; Engman, S.; Rodriguez, R.; Wilkenson, R.C. Identification of Four Vectors of Human *Plasmodium* spp. by Multiplex PCR: *Anopheles rangeli*, *An. Strodei*, *An. Triannulatus*, and *An. Trinkae* (Diptera: Culicidae: *Nyssorhynchus*). **Entomological Society of America**. v.41(6), p.1111-1115, 2004.
- Gaskell, G.J.; Carter, D.A.; Britton, W.J.; Tovey, E.R.; Benyon, F.H.L.; Lovborg, Y. Analysis of the internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA in common airborne allergenic fungi. **Electrophoresis**.w.18, p.1567–1569, 1997.
- Gentile, G.; Torre, A.d.T.; Maegga, B.; Jeffrey, R.P.; Caccone, A. Genetic Differentiation in the African Malaria Vector, *Anopheles gambiae* s.s., and the Problem of Taxonomic Status. **Genetics Society of America**. v.161, p.1561-1578, 2002.
- Giribet, G. Exploring the Behavior of Poy, a program for direct optimization of molecular data. **Cladistics**, v.17, p.S60-S70, 2001.
- Goday, C. ; Selivon, D. ; Perondini, A. L. P. ; Greciano, P. G. ; Ruiz, M. F. Cytological characterization of sex chromosomes and ribosomal DNA location in *Anastrepha* species (Diptera,Tephritidae). **Cytogenetic and Genome Research**. v.114, p.70-76, 2006.
- Haymer, D. S. Random amplified polymorphic DNAs and Microsatellites: What are they, and can they tell us anything we don't already know? **Annals of the Entomological Society of America**. v.87, p.717-722, 1994.
- Hernandez-Ortiz, V.; Gomez-Anaya J.A ; Sinchez, 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**. v.94, p.487-499, 2004.
- Hernandez-Ortiz, V. Diversidad y Biogeografía Del Género *Anastrepha*, em México. Em: V. Hernandez-Ortiz (Ed.), Mosca de la fruta en Latinoamérica (Diptera: Thepfitidae): Diversidad, Biología y manejo. S y G editores, Distrito Federal, México. p: 53-76, 2007.
- Hillis, D. M. Molecular versus morphological approaches to systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**. v.18, p.23-42, 1987.

- Hillis, D.H. & Dixon, M.T. Ribosomal DNA: Molecular evolution and Phylogenetic Inference. **The Quarterly Review of Biology**. v.66(4), p.411-453, 1991.
- Iwen, P. C.; Hinrichs, S. H.; Ruppy, M. E. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. **Medical Mycology**. v.40, p.87-109, 2002.
- Jowett, T.; Rizki, T.M.; Rizki, R.M. Regulation of synthesis of larval serum proteins after transplantation of larval fat body into adult *Drosophila melanogaster*. **Developmental Biology**. v.116(1), p.23-30, 1986.
- Kimura, M. The role of compensatory neutral mutations in molecular evolution. **Journal of Genetics**. v.64, p.7-19, 1985.
- Li, G.Q.; Hu, Y.L.; Kanu, S.; Zhu, X.Q. PCR amplification and sequencing of ITS1 rDNA of *Culicoides arakawe*. **Veterinary Parasitology**. v.112, p.101-108, 2003.
- Long, E. O., and I. B. Dawid. Repeated genes in eukaryotes. **Annual review of biochemistry**. v.49, p.727-764, 1980.
- Malavasi, A.; Zucchi, R.A.; Sugayama, R.L. Biogeografia. Em: **“Moscas das frutas de interesse econômico no Brasil: conhecimento básico e aplicado”**, Malavasi, A. e Zucchi, R.A. (eds.), Holos, Ribeirão Preto, p. 93-98, 2000.
- Marrelli, M.T.; Souza, L.F.; Marques, R.C.; Labruna, M.B.; Mاتيoli S.R.; Tonon, A.P.; Ribolla, P.E.M.; Marinotti, O.; Schumaker, T.T.S. Taxonomic and Phylogenetic relationships Between Neotropical Species of Ticks from Genus *Amblyomma* (Acari:Ixodidae) Inferred from Second Internal Transcribed Spacer Sequences of rDNA. **Journal of medical entomology**. v.44(2), p.222-228, 2007.
- Mascarenhas, R. O. **Endossimbionte *Wolbachia* em moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* (Tephritidae) em vespas parasitóides (*Braconidae*) associadas**. 80p. Dissertação de Mestrado. Depto. de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2007.
- McPheron, B.A.; Han, H-Y; Silva, J.G.; Norrbom, A.L. Phylogeny of genus *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based upon 16S rDNA mitochondrial sequences. Em: **Fruit flies (Tephritidae): phylogeny**

- and evolution of behavior**, M. Aluja e A.L. Norrbom (eds.), CRC Press, Boca Ratón, Florida, p. 343-361, 1999.
- Mendes, L.O.T. Observações citológicas em “moscas-das-frutas”. **Bragantia**. v.17, p.29-39, 1958.
- Morgante, J. S., Malavasi, A.; Bush, G. L. Biochemical systematics and evolutionary relationships of neotropical *Anastrepha*. **Annals of the Entomological Society of America**. v.73, p.622-30, 1980.
- Morgante, J.S.; Selivon, D.; Solferini, V.N.; Matioli, S.R. Evolutionary patterns in specialist and generalist species of *Anastrepha*. pp.133-47. In: M.Aluja & P. Liedo (eds.). **Fruit Flies: biology and management**. Springer, New York. Proceedings of the 3th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, 1993.
- Morrone, J.J. Biogeographic Areas and Transition Zones of Latin America and teh Caribbean Islands Based on Panbiogeographic and Cladistics Analyses of the Entomofauna. **Annual Review of Entomology**. v.51, p.467-494, 2006.
- Norrbom, A.L.; Zucchi, R.A.; Hernández-Ortiz, V. Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (*Trypetinae: Toxotrypanini*) based on morphology. p. 299-342. Em: **Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior**. Aluja, M., Norrbom, A.L. (eds.) CRC Press, Boca Ratón, Florida, 1999.
- Perrin, A.; Cetre-Sossah, C.; Mathieu, B.; Baldet, T., Delecolle, J.-C.; Albina, E. Phylogenetic analysis of *Culicoides* species form France on nuclear ITS1-rDNA sequences. **Medical and Veterinary Entomology**. v.20, p.219-228, 2006.
- Phillips, A.; Janies, D.; Wheller, W.C. Multiple Sequence alignment in Phylogenetic Analysis. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.11, n.3, p.317-330, 2000.
- Poon, A.; Chao, L. The rate of compensatory mutation in the DNA Bacteriophage X174. **Genetics Society of America**. v.170, p.989-999, 2005.
- Rocha, L.S.; Selivon, D. Studies on highly repetitive DNA in cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae), p. 415-418. Em:

- Proc. 6th Internatinal Fruit Flies Symposium, 6-10 May 2002, Stellenbosch, South Africa, Barnes, B. (ed.), **Isteg Scientific Publications**, Irene, Africa do Sul, 2004.
- Rocha, L.S. Estudo populacional de *Anastrepha sororcula* Zucchi 1979 (Diptera: Tephritidae): aspectos cariotípicos, morfométricos e moleculares. Tese de Doutorado. Depto. de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2005.
- Rojas, M.; Úbeda, J.M.; Cutillas, C.; Mora, M.D.; Ariza, C.; Guevara, D. Utility of ITS1–5.8S–ITS2 and 16S mitochondrial DNA sequences for species identification and phylogenetic inference within the *Rhinonyssus coniventrís* species complex (Acari: Rhinonyssidae). **Parasitology Research**. v.100, p.1041-1046, 2007.
- Santos, P. **Variabilidade do DNA mitocondrial em populações de três espécies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae)**. 312p. Dissertação de Mestrado. Depto. de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1994.
- Schlötterer, C.; Hauser, M.T.; von Haeseler, A.; Tautz, D. Comparative Evolutionary Analysis of rDNA ITS Region in *Drosophila*. **Molecular Biology and Evolution**. v.11(3), p.513-522, 1994.
- Sedaghat, M.M.; Linton, Y.M.; Oshaghi, M.A.; Vatandoost, H.; Harbach, R.E. The *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in Iran: molecular characterization and recognition of a new species. **Bulletin of Entomological Research**. v.93(6), p.527-535, 2003.
- Selivon, D. **Estudo sobre a diferenciação populacional em *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae)**. 137p. Tese de Doutorado. Depto. de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1996.
- Selivon, D.; Perondini, A.L.P. Eggshell morphology in two cryptic species of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**. v.91, p.473-478, 1998.
- Selivon, D.; Perondini, A.L.P.; Morgante, J.S. Haldane's rule and other aspects of reproductive isolation observed in the *Anastrepha fraterculus* complex

- (Diptera, Tephritidae). **Genetics and molecular biology**. v.22, p.507-510, 1999.
- Selivon, D.; Perondini, A.L.P.; Goday, C.; Sánchez, L.; Ruiz, M.F. **Caracterização de regiões heterocromáticas dos cromossomos mitóticos e do DNA ribossômico de espécies de *Anastrepha* (Diptera, Tephritidae)**. 50^o Congresso Nacional de Genética, Florianópolis, Setembro de 2004 (CD do Congresso), 2004a.
- Selivon, D.; Vretos, C.; Fontes, L.; Perondini, A.L.P. **New variant forms in the *Anastrepha fraterculus* complex**, pp 253-258. Proc. 6th International Fruit Flies Symposium, 6-10 May, Stellenbosh, South Africa, B. Barnes (ed.), Isteg Scientific Publications, Irene, Africa do Sul, 2004b.
- Selivon, D.; Perondini, 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**. v.98(3), p.367-381, 2005.
- Selivon, D. & Perondini, A.L.P. Especies crípticas del complejo *Anastrepha fraterculus* en Brasil. En: V. Henández-Ortiz (Ed.), Moscas de la Fruta en Latinoamérica (Diptera: Tephritidae): Diversidad, biología y manejo. S y G editores, Distrito federal, México. p.101-118, 2007.
- 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**. v.30, p.565-573, 2001.
- Sokal, R.R.; Rohlf, F. J. The principles and practice os statistics in biological research. **Biometry**. 2. Ed San Francisco: Freeman, p.859, 1981.
- Solferini, V.N.; Morgante, J.S. Karyotype study of eight species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). **Caryologia**. v.40, p.229-41, 1987.
- Steck, G.J. Biochemical systematics and population genetic structure of *Anastrepha fraterculus* and related species (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**. v.84, p.10-28, 1991.
- Steck, G.J.; Sheppard, W.S. Mitochondrial DNA variation in *Anastrepha fraterculus*, pp. 9-14. In: Aluja, M; Liedo, P. (eds.), **Fruit Flies: Biology and Management**. Springer-Verlag, New York, 1993.

- Stone, A. **The fruit flies of the genus *Anastrepha***. U.S. Dep. Of Agric., Miscellaneous Publication. v.439, p.1-112, 1942.
- Swofford, D. L., and G. J. Olsen. Phylogeny reconstruction. In D. M. Hillis and C. Moritz (eds.), **Molecular Systematics**, Sinauer Associates, Sunderland. v.41, p.1-501. 1990.
- Tautz, D.; Hancock, J.M.; Webb, D.A.; Tautz, C.; Dover, G. Complete sequence of the rRNA Genes of *Drosophila melanogaster*. **Molecular Biology and Evolution**. v.5(4), p.366-376, 1988.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. ClustalW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix. **Nucleic Acids Research**. v.22(22), p.4673-4680, 1994.
- Van Nues, R. W., M. J. Rientjes, C.A.F. M. van der Sander, S. F. Zerp, C. Sluiter, J. Venema, R. J. Planta, and H. A. Raue'. Separate structural elements within internal transcribed spacer1 of *Saccharomyces cerevisiae* precursor ribosomal RNA direct the formation of 17S and 26S rRNA. **Nucleic Acids Research**. v.22, p.912-919, 1994.
- Wesson, D. M., C. H. Porter, and F. H. Collins. Sequence and secondary structure comparisons of ITS rDNA in mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.1, p.253-269, 1992.
- Wheeler, W.C. Implied Alignment: a synapomorphy-based multiple-sequence alignment method and its use in cladogram search. **Cladistics**, v.19, p 261-268, 2003.
- White, I.M.; Elson-Harris, M.M. **Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics**. CAB International, Wallingford, UK, 1992.
- Young, I.; Coleman, A. The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: a *Drosophila* example. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.30, p.236-242, 2004.
- Zucchi, R.A. DIVERSIDAD, DISTRIBUCIÓN Y HOSPEDEROS DEL GÉNERO *ANASTREPHA* EN BRASIL. EN: V. Hernández-Ortiz (Ed.), **Moscas de la fruta en Latinoamérica (Diptera: Tephritidae): diversidad, biología y manejo**. S y G editores, Distrito Federal. Pp 77-1, 2007.

ANEXO I

Alinhamento das seqüências do ITS1 de amostras da América Latina gerado pelo ClustaW. (.) Igualdade; (-) “Gap”.

```

A. sp.1      CATATCCGTAAAAAACAAAAACAAACAATGCAAAAAAAAAAAAAAAAA-----
A. sp.2      .....-G.....-.....-.....-.....-.....-AAA
A. sp.3      .....G..T.....-.....-.....-.....-
Arg-Miss     .....-.....-.....-.....-.....-
Arg-Conc     .....CAAA-----AAAAAAAAAAAA
Arg-HMolle   .....-.....-.....-.....-
Arg-Tuc      .....-.....-.....-.....-
AY775552 (Tucuman) .....-.....-.....-.....-A
Peru-LMol    .....T....T.AAAACAAAAC-----GGGCAAAAAAAAAAAAAA
Peru-Piura   .....T..G.TAAAACAAAAC-----GGACAAAAAAAAAAAAAA
Equad-Gua (A. sp.4) .....-.....-.....-.....-AAAAAAAAGA
Col-Tol      .....G...---.....C....T....T..AACCCAAAACCGCTCAAAGGAAATAAAAAAA
Mex-Apaz     .....G...---.....C....C.T..C..--ACAAAAGGA-----AAAAAAAAAAAAAA
Mex-Tap      .....G...---.....A.C....C..C.C..-----GAAAAAAAAAAAAA
Mex-QRoo     .....G...---.....C....-.....-.....-AAAAAAAAAAAAAAC
Mex-Jica     .....G...---.....C....C.T.C.C..-----GCAAAAGAAAAA
Mex-Teoc     .....G...---.....C....C.T..C..--CCCAAAGGA-----AAAAAAAAAAAAAA
Guat-City    .....G...---.....C....C.T.C.---ACAAAAGGA-----AAAAAAAAAAAAATAA

```

```

A. sp.1      GAAAAAAAAAGAAAAATATATAATTATTTTGAA-TCCCATATTCTTTT-TATTCTTTTTCATTCAATTT--GTTATCC-AT
A. sp.2      .G.....G.-AT.....-.....-.....-.....-
A. sp.3      .....-T.-.....-.....-.....-
Arg-Miss     .....-T.-.....-.....-.....-
Arg-Conc     .....-T.-.....-.....-.....-
Arg-HMolle   .....-T.-.....-.....-.....-
Arg-Tuc      .....T.....-C.-.A.....-.....C..C.....-....C..-TA
AY775552 (Tucuman) .....-.....-.....-.....-.....-.....-

```

Peru-LMol	AG.....G.A.....-.....--.....-
Peru-Piura	AG.....--T.....-.....--.....-
Equad-Gua(A. sp.4)	A.....G.A...T.....--T.....-.....--.....-
Col-Tol	.C.....G.....T.....G...G..T--...A...C...-.....GG..C.....A..TG.....C..
Mex-Apaz	A..G...G.A....A..T.....--T.....A...-.....--.....-
Mex-Tap	--T.....-.....--.....-
Mex-QRoo	.GG.....A...G.A..T.....--T.....A...-.....--.....-
Mex-Jica	A.....-.....C...AAC.....--...TC...-C
Mex-Teoc	AGG.....A....A..T.....--T.....A...-.....--.....-
Guat-City	--G.....A....A..T.....--T.....A...-.....--.....-

A. sp.1	CC-----CC-----TTATATCATATTAAATATAATATGATGGTAC-----ATTTTGTAATGTTTTTTC-
A. sp.2	.AA-----.....-.....G.....-
A. sp.3	.AA-----.....-.....-
Arg-Miss	.AA-----.....-.....-
Arg-Conc	..AATTTGTTCTCTAT..ATCAA.....C-----C
Arg-HMolle	.AA-----.....-.....-
Arg-Tuc	.AT-----T.....T...G...C-----T....A..G.....-
AY775552 (Tucuman)	.AA-----.....-.....-
Peru-LMol	.AA-----.....-.....-
Peru-Piura	.AA-----.....-.....-
Equad-Gua (A. sp.4)	.AA-----.....-.....-
Col-Tol	.AA-----.....-.....A.G....TC
Mex-Apaz	.AA-----A.....GGGTGGTAC.....-
Mex-Tap	.AA-----A.....GGGTGGTAC.....G..G.....-
Mex-QRoo	.AA-----A.....GGGTGGTAC.....C.....-
Mex-Jica	.AT-----T..A..CC.....G..GGGGGGTAC....-GGGG.....-
Mex-Teoc	.AA-----A.....GGGTGGTAC.....-
Guat-City	.AA-----A.....GGGTGGTAC.....-

A. sp.1	TTATTTTTCTTTTAAAAA-CCTTTAAAC-ATGAAAATAAAAA-GTTGTACTTATTATT-CATCACATATATTT-GATTG
A. sp.2	-.....-.....-.....T.....
A. sp.3	-.....-.....-.....-.....
Arg-Miss	-.....-.....-.....-.....
Arg-Conc	A.....C.....-.....T.....-.....
Arg-HMolle	-.....-.....-.....-.....
Arg-Tuc	-.A....TC.....C.....-T.....-.....C...T..T..-.TC.C....T.....
AY775552 (Tucuman)	-.....-.....-.....-.....
Peru-LMol	-.....-.....-.....-----C...G.....
Peru-Piura	-.....-.....-.....-----C...G.....
Equad-Gua (A. sp.4)	-.....-.....-.....-----C...G.....
Col-Tol	-.....-.....A.....-----C.....
Mex-Apaz	TC...T...A.....-.....-.....-----C.....
Mex-Tap	TC...T...A.....-.....-.....-----C.....
Mex-QRoo	TC...T...A.....-.....-.....-----C.....
Mex-Jica	G...TC...C...A.T.....-A.....-G.A.....A..C-----C.....G.
Mex-Teoc	TC...T...A.....-.....-.....-----C.....
Guat-City	TC...T...A.....-.....-.....-----C.....

A. sp.1	AATGATAAGTTAATTTGTTTACAATAACAAAAGCGGTAT---ATATTTATTATTAT-----TATACA-TAAAATGATTA
A. sp.2	---.....-----
A. sp.3	TAT.....-----
Arg-Miss	---.....-----
Arg-Conc	---.....-----
Arg-HMolle	---.....G.....-----
Arg-Tuc	..G..A.....G.....---.....-----
AY775552 (Tucuman)	---.....-----
Peru-LMol	T.....---.....ACAATA.....A.....
Peru-Piura	T.....---.....ACAATA.....A.....
Equad-Gua (A. sp.4)	T.....---.....ACAATA.....A.....
Col-Tol	G.....T.....---.....A-----
Mex-Apaz	T.....---.....A-----

Mex-Tap	G..A..---.....A-----.....-
Mex-QRoo	T.....---.....A-----.....-
Mex-Jica	A....A.....C....G.G..A..---.A.....-----.....-
Mex-Teoc	T.....---.....A-----.....-
Guat-City	G.....T.....---.....A-----.....-

A. sp.1	GAAAATACAAAATAGT--GAATCATAATAAATACCACCAC-TGTATT-ATTGTT--GAAC-TAAGACATTCGCAACTTAA
A. sp.2	--.....-.....-.....-.....-
A. sp.3	--.....-.....-.....-.....-
Arg-Miss	--.....-.....-.....-.....-
Arg-Conc	--.....-.....-.....-.....-
Arg-HMolle	--.....-.....-.....-.....-
Arg-Tuc	C.....--.....C..C.-.....-.....-.....-.....G
AY775552 (Tucuman)	--.....-.....-.....-.....-
Peru-IMol	A.....A.AT...T.....-.....-.....-.....-
Peru-Piura	A.....A.AT...T.....-.....C-.....-.....-
Equad-Gua (A. sp.4)	A.....A.AT...T.....-.....-.....-.....-
Col-Tol	A.....Y.A.--T...T.....T.C.T.C--.....-.....-
Mex-Apaz	A.....T.....AA--.....-.....-.....-.....G.....
Mex-Tap	A.....A.G-A...T.....C.....-.....-.....C.....
Mex-QRoo	A....G.T.....AA--.....C.....C.....G..C.C.TGA.G.-.....GAGCT.
Mex-Jica	G-A.-.....-.....-.....-.....-
Mex-Teoc	A.....T.....AA--.....-.....-.....-.....-
Guat-City	A.....T.....AA--.....-.....-.....-.....-

A. sp.1	TAAA----A---ATGTTTAGAGTTAAATATATTTGATATAT---ATTATTGA--AAGAAAATCAA-TTTATATATTATTA
A. sp.2	---.....-.....-.....-.....-
A. sp.3	---.....-.....-.....-.....-
Arg-Miss	---.....-.....-.....-.....-
Arg-Conc	---.....-.....-.....-.....-


```

Arg-HMolle      ....---.---.....---GG..A.....C.....
Arg-Tuc          AT....---.CAC.....G.....CAG.....T.G.....
AY775552 (Tucuman) ....---.---.....---.....-.....
Peru-LMol        ....---.---.....---.....-.....A..
Peru-Piura        ....---.---.....---.....-.....A..
Equad-Gua (A. sp.4) ....---.---.....---.....-.....A..
Col-Tol          ....-----A.....ATT.....-.....A..
Mex-Apaz          ..-----AAA.....---.--TTGA.....T-.....
Mex-Tap          ...AAT-----T.....---.--A.A.A.....
Mex-QRoo          ..C.TA--.GAA.....G..A.....GGTGCA.....TC.....G.
Mex-Jica          ...AATT.TAA.....-.....C.....-.....-
Mex-Teoc          ..-----AAA.....---.--TTGA.....T-.....
Guat-City         ..-----AAA.....---.--TTGA.....T-.....

```

```

A. sp.1          TTATTATTATTTAA--TTTACT--CTTTC-AATTAATATATGCAAAAAAA--AATTGACATTTGTTATAAATAAAAAAT
A. sp.2          .....--.....--.....--.....TA
A. sp.3          .....--.....--.....--.....
Arg-Miss          .....--.....--.....--.....
Arg-Conc          .....-G.....-.....-.....
Arg-HMolle        .....-T--.....-.....-.....
Arg-Tuc           ...C.....G.AC..C.....GG..A.....C.....CA...C...AAA.....
AY775552 (Tucuman) .....--.....--.....--.....
Peru-LMol         -----G.--..A.....-..A..C-.....-.....
Peru-Piura        -----.....--.....-.....-.....
Equad-Gua (A. sp.4) -----.....--.....-..A.....-.....
Col-Tol           .....--.....---C..TC.....-.....-
Mex-Apaz          .---.....--.TT..ACT.....CTC.....-A.-.....-T..AT.....
Mex-Tap           .....--.....---C..TC.....-.....-.....T.....-
Mex-QRoo          .---..G.....C.AC..G.G.--C.GGA..A...G..C.....-A.C.....
Mex-Jica          .....--.....---C..TC.....-.....-.....
Mex-Teoc          .---.....--.TT.AA.TT.ACTC..TC.....-A.....AT..AT.....
Guat-City         .---.....TT..ACT.....CTC.....-A.-.....-T..AT.....

```

A. sp.1	AAATAAAAAAATAC
A. sp.2	..TA.....
A. sp.3	
Arg-Miss	
Arg-Conc	
Arg-HMolle	
Arg-Tuc	...C.....-
AY775552 (Tucuman)	
Peru-LMol	G....
Peru-Piura	..-.....G....
Equad-Gua (A. sp.4)	G....
Col-Tol	G....
Mex-Apaz	G.....
Mex-Tap	...-...G..T...
Mex-QRoo	
Mex-Jica	G.....
Mex-Teoc	G.....
Guat-City	G.....