Natália de Souza Araujo

Análise de espécies crípticas do complexo
Anastrepha fraterculus (Díptera: Tephritidae)
no Brasil através de sequências do gene
mitochondrial *cytochrome oxidase I*

Analyses of the *Anastrepha fraterculus* complex
(Diptera: Tephritidae) in Brazil based on
mitochondrial *cytochrome oxidase I* sequences

São Paulo

2012

Natália de Souza Araujo

Análise de espécies crípticas do complexo
Anastrepha fraterculus (Díptera: Tephritidae) no
Brasil através de sequências do gene mitocondrial
cytochrome oxidase I

Analyses of the *Anastrepha fraterculus* complex
(Diptera: Tephritidae) in Brazil based on
mitochondrial *cytochrome oxidase I* sequences

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.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz
Paranhos Perondini

São Paulo

2012

Araujo, Natália de Souza

Análise de espécies crípticas do complexo *Anastrepha fraterculus* (Díptera: Tephritidae) no Brasil através de sequências do gene mitocondrial *cytochrome oxidase I*

79 páginas.

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

1. Mosca-das-frutas 2. mtCOI 3. Espécies crípticas I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. André Luiz Paranhos Perondini
Orientador

À minha família de ontem, de hoje e de sempre.

"Tell me and I forget.
Teach me and I remember.
Involve me and I learn."

Benjamin Franklin
(1706 - 1790)

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. André Luiz Paranhos Perondini, pela orientação e conselhos, principalmente na etapa final deste trabalho.

À Profa. Dra. Denise Selivon Scheepmaker, pela colaboração e incentivo no decorrer deste projeto.

Ao Leandro Fontes Prezotto, pelos ensinamentos de práticas de laboratório e pelo auxílio com a preparação das amostras. Mas principalmente, pela amizade e paciência.

Aos colegas que passaram pelo Laboratório de Estudos Evolutivos de Moscas-das-Frutas: Roberto, Daniel e Fernando. Por tornarem o ambiente de trabalho agradável e enriqueceram discussões essenciais para minha formação.

À Georgina Elzi Santos, pelos auxílios com a manutenção das colônias em laboratório.

Ao Walmir, por enriquecer as coletas encontrando frutos onde ninguém mais encontraria.

Aos Profs. Drs. Fábio Mesquita do Nascimento e João Carlos Shimada Borges, pelos ensinamentos, incentivo e amizade. Que, certamente, foram decisivos para minha formação pessoal e profissional.

Aos meus pais e irmão, Elton, Roseli e Elton Jr., pelo carinho e confiança, principalmente nos momentos decisivos.

À minha sogra, Kimiko, por permitir que o meu tempo fosse multiplicado no decorrer deste projeto.

Ao meu marido, Ricardo, por sempre estar presente e me apoiar incondicionalmente.

E, finalmente, a minha querida filha Julia, cujo sorriso sempre me motiva.

Apoios financeiros
FAPESP (Proc. 2010/52040-8)
Bolsa institucional de mestrado- CNPq

Índice

I. INTRODUÇÃO.....	09
II. OBJETIVOS.....	15
III MATERIAL E MÉTODOS	16
III.1. Espécies locais de coleta e frutos hospedeiros.....	16
III.2. Extração de DNA.....	21
III.3. Amplificação do gene COI.....	21
III.4. Eletroforese.....	22
III.5. Sequenciamento do DNA.....	22
III.6. Análises computacionais e estatísticas.....	23
IV. RESULTADOS.....	24
IV.1. Análise das amostras coletadas.....	24
IV.1.1 Análises de haplótipos e distância.....	25
IV.1.2. Análises populacionais.....	28
IV.1.3. Análises de introgressão da molécula mitocondrial.....	33
IV.1.4. Análises filogenéticas.....	35
IV.2. Análise ampliada do complexo <i>fraterculus</i>	38
IV.3. Análise do grupo infragenérico <i>fraterculus</i>	41
V. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....	44
VI. RESUMO.....	51
VII. ABSTRACT.....	53
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
VIII.1. Referências digitais.....	61
IX. ANEXOS.....	62

I. Introdução

A família Tephritidae é uma das maiores dentro da ordem Díptera e segundo Norrbom *et al.* (1999) contava com 4.352 espécies e subespécies descritas e agrupadas em 481 gêneros. Esta família também congrega cerca de 38% das espécies que utilizam frutos como substrato alimentar no estágio larval, adquirindo o status de inseto-praga quando esses frutos são de valor comercial (White e Elson-Harris, 1992). As espécies-praga pertencem aos gêneros *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Ceratitis*, *Dacus*, *Rhagoletis* e *Toxotrypana* (White e Elson-Harris, 1992) e no Brasil as espécies mais importantes pertencem aos gêneros *Anastrepha* e *Ceratitis* (Malavasi *et al.*, 2000).

Quanto à utilização de recursos pelo estágio larval, algumas espécies, por exemplo, de *Anastrepha*, podem ser altamente especializadas na exploração de algum tipo de hospedeiro, como *A. pickeli* e *A. montei*, que utilizam as sementes dos frutos da mandioca (*Manihot esculenta*) (Norrbom e Kim, 1988; Morgante *et al.*, 1996) e *A. pseudoparalella* que utiliza sementes de frutos do gênero *Passiflora* (Norrbom e Kim, 1988; Stefani e Morgante 1996). Por outro lado, algumas espécies são generalistas infestando um grande número de hospedeiros não correlacionados (Norrbom e Kim, 1988). A relação entre as diferentes espécies e seus hospedeiros é especialmente interessante evolutivamente, pois, segundo Norrbom (2002), as associações de certas espécies com um determinado gênero ou família de hospedeiros estariam correlacionadas, ao menos parcialmente, à filogenia do gênero.

O gênero *Anastrepha* é endêmico do Continente Americano e compreende 212 espécies descritas das quais 109 ocorrem no Brasil (Uramoto, 2007; Zucchi, 2011). A identificação das espécies é baseada quase que exclusivamente em fêmeas adultas, mais especificamente, na morfologia do ápice do ovipositor (Zucchi, 2000). Norrbom *et al.* (1999) com base em características morfológicas, agruparam as espécies de *Anastrepha* em 17 grupos infragenéricos que foram corroborados por análises moleculares do gene ribossômico mitocondrial 16S (McPheron *et al.*, 1999) e do gene nuclear *period* (Barr *et al.*, 2005). As espécies registradas no Brasil pertencem a 12

destes grupos, sendo que os grupos com maior número de espécies são: *fraterculus* e *mucronota* com 17 espécies cada, *pseudoparalella* (9), *robusta* e *spatulata* (5), *serpentina* (5), *daciformis* (4), *dentata*, *grandis* e *punctata* (4), *leptozona* (3) e *benjamini* (1) (Zucchi, 2007).

Considerando-se a importância econômica deste gênero no Brasil, destacam-se as espécies *A. fraterculus* (Wiedmann), *A. obliqua* (Macquart), *A. sororcula* Zucchi, *A. zenildae* Zucchi e *A. distincta* Greene, que pertencem ao grupo infragenérico *fraterculus*; *A. grandis* (Macquart), do grupo *grandis*; *A. pseudoparalella* (Loew), do grupo *pseudoparalella*; *A. bistrigata* Bezzi, *A. serpentina* (Wiedmann) e *A. striata* Schiner, do grupo *serpentina* (Zucchi, 2007).

Um dos grupos infragenéricos que tem recebido muita atenção nos últimos anos é o grupo *fraterculus* por congregar muitas das espécies-praga (White e Elson-Harris, 1992; Aluja, 1994). Existem várias espécies morfológicamente similares dentro do grupo *fraterculus*, que inclui cerca de 27 espécies, o que pode ser um indicativo de que este grupo tenha uma história evolutiva recente (Aluja, 1994; McPheron *et al.*, 1999; Norrbom *et al.*, 1999; Smith-Caldas *et al.*, 2001).

A espécie de maior importância econômica no grupo é *A. fraterculus* (*sensu lato*) (Wiedmann), distribuída nas Américas entre as latitudes 35°N e 35°S (Malavasi *et al.*, 2000), abrangendo desde o Sul dos Estados Unidos da América até a Argentina e ocupando ambientes bastante distintos com clima tropical e subtropical. Esta espécie é generalista e, utiliza mais de 90 frutos hospedeiros pertencentes a 35 famílias diferentes (Malavasi *et al.*, 2000; Zucchi, 2007).

Em 1942, Stone reconheceu que em *A. fraterculus* havia uma extensa variação na morfologia das asas, mas preferiu considerá-las como raças geográficas. Em 1944, Baker *et al.* sugeriram que um complexo de espécies crípticas poderia estar envolvido. Em 1962, Bush encontrou diferenças cromossômicas entre as populações mexicanas e as do Sudeste do Brasil (descritas por Mendes, 1958) e sugeriu que poderiam se tratar de duas espécies distintas. Estudos posteriores corroboraram esta hipótese utilizando diversas características biológicas, tais como: cariótipo (Solferini e Morgante, 1987; Morgante *et al.*, 1993), isozimas (Morgante *et al.*, 1980; Steck, 1991;

Amaral, 1994; Alberti *et al.*, 1999, 2002; Basso *et al.*, 2003), DNA mitocondrial (mtDNA) (Steck e Sheppard, 1993; McPherson *et al.*, 1999; Smith-Caldas *et al.*, 2001) e o gene *period* (Barr *et al.*, 2005).

Estes, entre outros estudos, suportam a sugestão de que a espécie *A. fraterculus* abriga um complexo de espécies crípticas, denominado “complexo *fraterculus*” (Morgante *et al.*, 1980). No entanto, grande parte dos estudos realizados foi feita de forma independente, com o uso de técnicas diversas aplicadas às diferentes amostras populacionais. Isso, apesar de agregar informações importantes a respeito da biologia e evolução dessa espécie, dificultou a comparação dos resultados dos diferentes trabalhos. Impossibilitando a determinação do exato número de espécies existentes no complexo (Selivon, 1996).

Assim, considerando-se a problemática existente em *A. fraterculus*, estudos padronizados e conjuntos foram realizados para melhor compreender este complexo de espécies crípticas, principalmente no Brasil. Através das análises de isozimas (Selivon, 1996; Selivon *et al.*, 2005), dos cariótipos (Selivon, 1996; Selivon *et al.*, 2004, 2005; Goday *et al.*, 2006), da estrutura dos ovos (Selivon e Perondini, 1998; Selivon *et al.*, 2004), da morfometria de estruturas dos adultos (Selivon, 1996; Selivon *et al.*, 2005), da análise de compatibilidade reprodutiva (Selivon *et al.*, 1999, 2005) e do marcador molecular ITS1 (Prezotto, 2008), foram caracterizadas três espécies no complexo, *Anastrepha* sp.1 *affinis fraterculus*, *A. sp.2 aff. fraterculus* e *A. sp.3 aff. fraterculus* que ocorrem no Brasil e outra, *A. sp.4 aff. fraterculus*¹ em Guayaquil - Equador (Selivon *et al.*, 2004).

Adicionalmente, Hernández-Ortiz *et al.* (2004) e Prezotto (2008) com amostras de diversos países da América, demonstraram que outras espécies devem existir no complexo *fraterculus* ao longo da Região Neotropical. Corroborando esses dados, Vera *et al.* (2006) verificaram a incompatibilidade reprodutiva entre populações de diversas regiões da América Latina e Cáceres *et al.* (2009), demonstraram que populações da Argentina são diferentes das existentes no Peru em várias características biológicas.

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*.

As três espécies do complexo *fraterculus*, conhecidas até o momento no Brasil, são encontradas em diferentes e extensas regiões geográficas. Embora o conhecimento dessa distribuição não esteja ainda completo, os dados mostram que *A. sp.1* é encontrada no Centro-Oeste do país, no Altiplano brasileiro de Minas Gerais ao sul e ocorre em simpatria com *A. sp.2* e *A. sp.3* no vale do Rio Paraíba, *A. sp.2* ocorre em todo o litoral Leste do Brasil, desde o Nordeste até o Rio Grande do Sul e *A. sp.3* ocorre em simpatria com *A. sp.2* no litoral, desde o Rio de Janeiro até o sul do País (Selivon *et al.*, 2004, 2005; Selivon e Perondini, 2007).

Alguns marcadores moleculares já foram utilizados para realizar estudos filogenéticos em tefritídeos, com o objetivo de revisar taxonomias e conhecer melhor a história evolutiva das espécies de moscas-das-frutas, tais como os microsátélites (Augustinos *et al.*, 2005 e Velez *et al.*, 2005), DNA mitocondrial (Smith-Caldas *et al.*, 2001; Jamnongluck *et al.*, 2003; Clarke *et al.*, 2005; Han e Ro, 2005) e genes nucleares (An *et al.*, 2004; Barr *et al.*, 2005). Em 2008, Prezotto construiu a filogenia do complexo *fraterculus* com base em sequências do espaçador ribossômico nuclear ITS1, que corroborou as diferenças interespecíficas. No entanto, mostrou baixa diferenciação entre as populações amostradas no Brasil.

Assim, embora este seja um marcador confiável para inferências filogenéticas e para a identificação de espécies em complexos de espécies crípticas (Gentile *et al.*, 2002; Fritz *et al.*, 2004), incluindo as moscas-das-frutas (Douglas e Haymer, 2001; Clarke *et al.*, 2005), a diversidade do complexo *fraterculus* seria melhor compreendida se fosse avaliada por outros marcadores moleculares, além dos estudos já consolidados. Além disso, Malavasi e Morgante (1981) demonstraram que em *Anastrepha* ocorrem reduções drásticas no tamanho populacional (efeito gargalo); que podem levar à perda de alelos e redução da variabilidade populacional. Assim, a estrutura filogenética e a história evolutiva do grupo poderia ser melhor compreendida com a análise de múltiplos marcadores.

Várias características tornam o DNA mitocondrial uma ferramenta importante para análises filogenéticas, como o fato de ser uma molécula com herança predominantemente materna, por apresentar ausência ou baixíssima taxa de recombinação na maioria dos táxons e altas taxas de evolução quando

comparado ao DNA nuclear (cerca de 4,5 a 9,0 vezes mais rápida) (Avice *et al.*, 1979; Avice, 2009; Ballard e Whitlock, 2004).

Geralmente, assume-se que a variação em sua sequência ocorra de forma neutra, expandindo a utilização deste marcador para inferir histórias populacionais de espécies relacionadas (Ballard e Whitlock, 2004). No entanto, nos últimos anos, muitos estudos observaram que haplótipos de mtDNA apresentam regularmente comportamento não neutro em populações experimentais (Rand *et al.*, 1994; Gerber *et al.*, 2001; Ballard e Whitlock, 2004; Hurst e Jiggins, 2005). Assim, a seleção direta (no próprio mtDNA) ou indireta (seleção proveniente do desequilíbrio de transmissão) são comuns e tornam os dados mitocondriais difíceis de interpretar (Hurst e Jiggins, 2005).

Além disso, a falta de recombinação no mtDNA faz com que a molécula inteira apresente a mesma história evolutiva e aumenta a sensibilidade deste DNA a certos processos como introgressão e varreduras seletivas (“selective sweep”). No processo de introgressão, por exemplo, a genealogia gerada por genes mitocondriais pode divergir dos dados indicados por outros genes, principalmente em relação a genes nucleares, porque o mtDNA é mais suscetível a introgressão e há vários exemplos de introgressão mitocondrial desacompanhada de introgressão nuclear (revisado por Ballard e Whitlock, 2004).

A filogenia resultante da hibridação introgressiva é bastante semelhante à esperada em situações de polimorfismo ancestral com diferenciação incompleta das linhagens e, na maioria dos casos, ocorre em áreas de simpatria e parapatia. Consequentemente, o processo de introgressão resulta na ausência de padrão geográfico e de divergência entre os grupos de espécies envolvidas (Ballard e Whitlock, 2004). Assim, para auxiliar a correta interpretação dos dados mitocondriais, é conveniente que as análises sejam acompanhadas por outro marcador molecular que sofra recombinação como marcadores do DNA nuclear (Gerber *et al.*, 2001; Ballard e Whitlock, 2004).

Genes mitocondriais que codificam proteínas, como *cytochrome oxidase I* (COI) e *cytochrome oxidase II* (COII), tendem a evoluir mais rapidamente e têm sido muito utilizados para a resolução de diversos problemas taxonômicos (Barr e McPheron, 2006). O gene COI, estudado em uma enorme variedade de organismos, além de ser utilizado em inferências filogenéticas também é

aplicado no desenvolvimento de “DNA Barcoding” para identificação de várias espécies de animais como aves (Herbert *et al.*, 2004a) e insetos (Herbert *et al.*, 2004b; Hajibabaei *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007), embora nem sempre com resultados positivos (Withworth *et al.*, 2007). Armstrong e Ball (2005) verificaram ainda que, as sequências de COI aparentam ter uma habilidade limitada para distinguir taxa dentro de complexos de espécies de moscas-das-frutas, como os complexos *B. dorsalis*, *B. tryoni* e *A. fraterculus*.

Com o gene mitocondrial *cytochrome oxidase II* (COII), Alberti *et al.* (2008) realizaram uma análise filogeográfica de populações de *A. fraterculus sensu lato* da Argentina e de uma amostra do sul do Brasil. Os autores demonstraram que nestas regiões, apesar do polimorfismo gênico encontrado, deve existir apenas uma entidade biológica do complexo *fraterculus*, corroborando resultados obtidos anteriormente (Basso e Manso, 1998; Alberti *et al.*, 1999, 2002 e 2008)

Com o gene mitocondrial *cytochrome oxidase I* (COI) foram descritas as relações entre espécies de diferentes grupos taxonômicos infragenéricos, incluindo o grupo *fraterculus* (Smith-Caldas *et al.*, 2001; Boykin *et al.*, 2006). Os resultados dessas análises moleculares mostraram uma congruência com a filogenia baseada em características morfológicas (Norrbon *et al.*, 1999), mas evidenciaram os problemas relativos à *A. fraterculus* quando amostras de diferentes áreas geográficas são incluídas para esta espécie em caráter nominal. O trabalho de Smith-Caldas *et al.* (2001), com o objetivo de revisar as relações filogenéticas das espécies pertencentes ao grupo infragenérico *fraterculus*, verificou que as amostras de *Anastrepha fraterculus s. l.* não formam um grupo monofilético, o que os autores atribuíram à possível existência de espécies crípticas. Como dito anteriormente, algumas das espécies crípticas do complexo *fraterculus* já foram caracterizadas por outros estudos e marcadores biológicos (Selivon, 1996; Selivon e Perondini, 1998; Selivon *et al.*, 1999; 2004, 2005; Goday *et al.*, 2006; Prezotto, 2008), logo as análises filogenéticas devem ser realizadas com as espécies corretamente nomeadas.

II. Objetivos

Objetivo Geral:

Examinar o complexo *A. fraterculus* no sudeste do Brasil através da análise das sequências de fragmentos de DNA do gene mitocondrial *cytochrome oxidase I* (COI).

Objetivos específicos:

- Caracterizar diferentes amostras populacionais das três espécies do complexo *fraterculus* no Brasil.
- Determinar a distribuição dos haplótipos e a estrutura populacional do complexo *fraterculus* no Brasil, em regiões de simpatria e alopatria.
- Realizar uma análise filogenética das diferentes amostras populacionais do complexo no Brasil.
- Realizar uma análise filogenética de diferentes amostras populacionais do grupo infragenérico *fraterculus*.

III. Material e Métodos

III. 1. Espécies, locais de coleta e frutos hospedeiros

As amostras populacionais das espécies do complexo *fraterculus* (*A. sp.1*, *A. sp.2* e *A. sp.3*) coletadas no Brasil, podem ser observadas na Tabela I. Nas regiões de simpatria em pontos ao longo do Vale do Rio Paraíba, em São Paulo e Rio de Janeiro, a *A. sp.1* e a *A. sp.3* foram obtidas de goiabas (*Psidium guajava*) e a *A. sp.2* de laranja (*Citrus sp.*). No litoral, as amostras de *A. sp.2* e *A. sp.3* foram coletadas em goiabas e chapéu de sol (*Terminalia cattapa*), e as amostras de *A. sp.1*, das regiões de alopatria (Piracicaba, SP; Botucatu, SP; Ibiúna, SP e Uberlândia, MG), foram obtidas em goiaba.

Algumas das amostras de DNA utilizadas por Prezotto (2008), que analisou as espécies crípticas do complexo *fraterculus* no Brasil e outras amostras da região Neotropical com o uso do marcador ITS-1, foram amplificadas com o marcador COI e utilizadas nesta análise. Correspondem as amostras de: *A. sp.1* de Santa Isabel (SP), São Luis do Paraitinga (SP), Botucatu (SP), Uberlândia (MG) e Três Rios (RJ); de *A. sp.2* de Ubatuba (SP) e Ilha Bela (SP); de *A. sp.3* de Ubatuba (SP) e de *A. sp.4* Guayaquil (Equador) presentes na Tabela I. Nesta tabela também estão listadas as amostras da espécie nominal *A. fraterculus* depositadas por Smith-Caldas *et al.* (2001) no banco de dados GenBank (NCBI) e que estão identificadas pelos respectivos números de acesso.

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

Tabela I. Localidade, coordenadas geográficas e hospedeiros das amostras populacionais do complexo *A. fraterculus* utilizadas.

Espécie	Local de coleta	Coordenadas	Nº de indivíduos utilizados	Fruto Hospedeiro	Nº de acesso
A. sp.1	Salesópolis (SP)	23°31'55"S 45°50'45"O	4	Goiaba (<i>Psidium guajava</i>)	
	Jacareí (SP)	23°18'18"S 45°57'57"O	2	Goiaba	
	Botucatu (SP)	22°56'18"S 48°13'25"O	5	Goiaba	
	Lorena (SP)	22°43'51"S 45°07'30"O	4	Goiaba	
	Três Rios (RJ)	22°07'21"S 43°13'16"O	4	Goiaba	
	Uberlândia (MG)	18°56'46"S 48°13'55"O	4	Goiaba	
	São Luís do Paraitinga (SP)	23° 12' 31"S 45° 20' 16"O	4	Goiaba	
	Santa Isabel (SP)	23° 19' 25"S 46° 13' 17"O	5	Goiaba	
	Ibiúna (SP)	23°39'21"S 47°13'22"O	4	Goiaba	
	Jambeiro (SP)	23°15'14"S 45°41'16"O	3	Goiaba	
	Piracicaba	22° 43' 30" S 47° 38' 56" O	4	Goiaba	
A. sp.2	Taubaté (SP)	23°01'33"S 45°33'31"O	4	Laranja (<i>Citrus sp</i>)	
	Ubatuba (SP)	23° 26' 49"S 45° 04' 04"O	7	Chapéu-de-sol (<i>Terminalia cattapa</i>) // Goiaba	
	Ilha Bela (SP)	23° 48' 54" S 45° 22' 14" O	2	Chapéu-de-sol	

A. sp.3	Salesópolis (SP)	23°31'55"S 45°50'45"O	4	Goiaba	
	Ubatuba (SP)	23° 26' 49"S 45° 04' 04"O	5	Chapéu-de-sol	
	São Luís do Paraitinga (SP)	23° 12' 31"S 45° 20' 16"O	7	Goiaba	
	Jambeiro (SP)	23°15'14"S 45°41'16"O	3	Goiaba	
A. sp. 4	Guayaquil – Equador	2° 10' S 79° 54' O	1	Goiaba	
<i>A. fraterculus s.l.</i> (Smith-Caldas et al., 2001)	Janaúba (MG)	15° 45' S 43° 25' O	1	-	AF420614
	Santo Amaro (BA)	12° 33' S 38° 42' O	1	-	AF420640
	Chapecó (SC)	26° 06' S 52° 36' O	1	-	AF420612
	Linhares (ES)	19° 25' S 40° 02' O	1	-	AF420638
	Vacaria (RS)	28° 30' S 50° 54' O	1	-	AF420616
	Caçador (SC)	26° 47' S 50° 00' O	1	-	AF420636
	São José da Bela Vista (SP)	20° 35' S 47° 38' O	1	-	AF420642
	Monte Alegre do Sul (SP)	23° 07' S 46° 33' O	1	-	AF420615
	Palin (Guatemala)	14° 24' S 90° 42' O	1	-	AF420613
	Tucumán (Argentina)	26° 49' S 65° 13' O	1	-	AF420630
	Caracas (Venezuela)	10° 22' S 64° 27' O	1	-	AF420617
	La Mesa (Colombia)	05° 00' S 74° 37' O	1	-	AF420631
	Mérida (Venezuela)	08° 35' S 71° 08' O	1	-	AF420632
	Chiapas	14° 32' S	1	-	AF420637

	(Mexico)	90° 23' O			
	Puntarenas (Costa Rica)	09° 22' S 84° 00' O	1	-	AF420639
	Sevilla (Colômbia)	06° 01' S 73° 37' O	1	-	AF420641

Foram também utilizadas amostras de outras espécies de moscas-das-frutas, mostradas na Tabela II. Estando as sequências destas amostras depositadas no GenBank (NCBI) por Smith-Caldas *et al.* (2001) e identificadas por seus números de acesso. As amostras de outras espécies de moscas-das-frutas que foram analisadas neste trabalho, a partir de materiais armazenados à -20°C, podem ser identificadas pela ausência dos números de acesso.

Tabela II. Localidade, coordenadas geográficas e número de acesso das amostras de outras espécies de moscas-das-frutas.

Espécie	Local de coleta	Coordenadas	Nº de indivíduos utilizados	Nº de acesso
<i>A. acris</i>	Falcon Venezuela	10° 03'N 69° 18'O	1	AF420625
<i>A. amita</i>	Santa Inês (MA) Brasil- 1	03° 40'S 45° 22'O	1	AF420626
	Victoria Parish Trinidad and Tobago- 2	10° 15'N 61° 27'O	1	AF420627
	Piracicaba (SP) Brasil- 3	22° 43'S 47° 37'O	1	AF420628
<i>A. bahiensis</i>	Taxisco Guatemala	14° 04'N 90° 28'O	1	AF420649
<i>A. coronilli</i>	Palmichal Venezuela	10° 00'N 66° 43'O	1	AF420650
<i>A. ludens</i>	Santa Engracia México	24° 01'N 99° 12'O	1	AF420611
<i>A. distincta</i>	Trujillo Venezuela- 1	09° 22'N 70° 26'O	1	AF420629
	Cruz das Almas (BA) Brasil- 2	12° 40'S 39° 10'O	1	AF420634

	Santa Inês (MA) Brasil- 3	03° 40'S 45° 22'O	1	AF420635
<i>A. obliqua</i>	Conceição do Almeida (BA) Brasil- 1	12° 45'S 39° 15'O	1	AF420618
	Janaúba (MG) Brasil- 2	15° 45'S 43° 25'O	1	AF420619
	Linhares (ES) Brasil- 3	19° 25'S 40° 02'O	1	AF420620
	Narandiba (SP) Brasil- 4	22° 24'S 51° 31'O	1	AF420621
	Los Tuxtlas México- 5	18° 26'N 95° 11'O	1	AF420643
	Actopan México- 6	20° 16'N 98° 56'O	1	AF420644
	Natal (RN) Brasil- 7	05° 47'S 35° 13'O	1	AF420645
	Sevilla Colômbia- 8	06° 01'N 73° 37'O	1	AF420646
	São Paulo (SP) Brasil- 9	23° 32' S 46° 38' O	2	-
	Taubaté (SP) Brasil- 10	23°01'S 45°33'O	1	-
<i>A. sororcula</i>	Mossoró (RN) Brasil- 1	05° 11'S 37° 20'O	1	AF420622
	Rosana (SP) Brasil- 2	22° 37'S 53° 03'O	1	AF420623
<i>A. suspensa</i>	Gainesville USA	29° 40'N 82° 20'O	1	AF420652
<i>A. turpinae</i>	Santa Inês (MA) Brasil	03° 40'S 45° 22'O	1	AF420653
<i>A. zenildae</i>	Mossoró (RN) Brasil- 1	05° 11'S 37° 20'O	1	AF420624
	Lagoinha (PI) Brasil- 2	05° 49'S 42° 37'O	1	AF420654
	Santa Inês (MA) Brasil- 3	03° 40'S 45° 22'O	1	AF420655

	São Paulo Brasil- 4	21° 49' S 49° 12' O	1	-
<i>A. grandis</i>	São Paulo Brasil	21° 49' S 49° 12' O	1	-
<i>A. striata</i>	Minas Gerais Brasil	19° 49' S 43° 57' O	1	-
<i>A. bistrigata</i>	Minas Gerais Brasil	19° 49' S 43° 57' O	1	-
<i>Ceratitis capitata</i>	São Paulo Brasil	21° 49' S 49° 12' O	1	-

III. 2. Extração de DNA

As extrações de DNA foram realizadas seguindo 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 macerado 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.]. O material foi então incubado a 65°C por 1 hora e posteriormente, incubado a 4°C por 45 min., seguido de centrifugação a 12.000g 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 12.000g. O precipitado foi seco e resuspendido em 20 µl de H₂O milli-Q (Millipore). As amostras de DNA recém extraído foram tratadas com RNAase (Ribonuclease A, Sigma) com concentração final 100 µg/mL por 1 hora a 37°C, para eliminar o RNA. O material foi então mantido a -20°C.

III. 3. Amplificação do gene COI

A amplificação do fragmento do gene mitocondrial COI foi realizada nas amostras descritas anteriormente através da reação em cadeia da polimerase

(PCR) com os iniciadores utilizados por Harvey *et al.* (2003) e Simon *et al.* (1994):

C1-J-1718 - 5'-3' GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC

TL2-N-3014 - 5'-3' TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA

A amplificação foi realizada em um volume final de 20µL, com 20ng do DNA (de um único indivíduo), 1,2µL de dNTPs, 1µL de cada iniciador, 1,2 µL de MgCl₂, 0,2 µL de Taq polimerase e 2µL de TaqBuffer. O ciclo de amplificação utilizado foi o seguinte: primeiro período de desnaturação à 94°C por 90seg.; 36 ciclos (desnaturação à 94°C por 22 seg.; anelamento à 48°C por 30seg.; extensão à 72°C por 80 seg.); período final de extensão à 72°C por 60 seg..

III. 4. Eletroforese

Alíquotas do DNA amplificados 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, visualizados em um transiluminador UV com filtro vermelho. As imagens dos géis foram digitalizadas em uma câmera digital (Vilber Loumart) e transferidas para o computador para análise.

III. 5. Sequenciamento do DNA

As sequências referentes ao fragmento de interesse foram submetidas ao processo de purificação com o "kit" da Eppendorf. A preparação para o sequenciamento dos fragmentos foi feita com o "kit" para sequenciamento automático BigDye 2.0 (Applied Biosystems). Em cada reação foram usados 200ng de fragmento amplificado purificado, 2 pmol de um dos iniciadores e 4µL de BigDye. O programa de reações utilizado no aparelho termociclador Eppendorf é de 2min a 94°C, 25 ciclos de 30s de desnaturação a 94°C, 30s de anelamento a 60°C e 2min de elongação a 68°C.

O sequenciamento foi feito no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ USP), no aparelho de sequenciamento automático ABI-377 (Applied Biosystems), e os eletroferogramas foram analisados pelo programa BioEdit Sequence Alignment (1997), para comparação das réplicas e eliminação de erros de leitura.

III. 6. Análises populacionais e filogenéticas

Sequências de 1139pb dos fragmentos amplificados foram inicialmente analisadas pelo programa BioEdit Sequence Alignment (1997) versão 7.0.5 e alinhadas pelo método ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) com o programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011). A identificação dos haplótipos foi feita através do programa DnaSPv5 (Librado e Rozas, 2009) a partir das sequências obtidas.

Para as análises de estruturação populacional, distância entre os haplótipos, teste de desvio de neutralidade e estatística das análises de “mismatch” foi utilizado o programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010) com a incrementação gráfica do programa R (r-project.org). Os gráficos de “mismatch” e as análises de diversidade haplotípica (H) foram gerados pelo programa DnaSPv5 (Librado e Rozas, 2009). O teste de seleção foi realizado no programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011).

Com o programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) também foram geradas as matrizes de distâncias entre as sequências pelo método “Kimura dois parâmetros” (K2P) e as inferências filogenéticas pelo método de verossimilhança (ML). Para a escolha do melhor modelo de ML foi utilizado o programa jModelTest 0.1 (Posada, 2008) com o método de análise BIC, sugerido por Ripplinger e Sullivan (2008). O suporte para as árvores foi estimado por “bootstraps” com 1000 réplicas (Felsenstein, 1985) e as edições das árvores feitas pelo programa FigTree v1.3.1 (tree.bio.ed.ac.uk).

A rede de haplótipos foi gerada pelo programa Network 4.6 (fluxus-engineering.com), com a opção de cálculos “Median Joining” (MJ) (Bandelt *et al.*, 1999) e pós-processamento de máxima parcimônia (MP) (Polzin e Daneschmand, 2003).

IV. Resultados

IV. 1. Análise das amostras coletadas

Para analisar as linhagens mitocondriais do complexo *fraterculus*, com foco em sua ocorrência no Brasil, foram amplificados e sequenciados fragmentos do gene COI de 76 indivíduos provenientes de 19 diferentes amostras populacionais, coletadas em 15 localidades (Tabela I; Anexo II), com uma média de cinco indivíduos de cada espécie por amostra.

O gene mitocondrial COI apresenta aproximadamente 1540pb em moscas-das-frutas (Clary *et al.*, 1982; Nardi *et al.*, 2003 e Yu *et al.*, 2007) e o fragmento gênico sequenciado é de 1139pb (Figura 1), o que representa aproximadamente 74% de todo o gene. Alinhando-se as sequências completas do gene com os fragmentos amplificados, foi possível verificar que este é codificante desde a primeira base, correspondendo à região entre 322-1460 do gene de outros gêneros de moscas-das-frutas. O fragmento gênico sequenciado apresenta alta similaridade com as demais cópias mitocondriais, o que indica que este não é cópia de uma região nuclear não funcional. A proporção de bases é de 37,4% T, 15,6% C, 32,2% A e 14,7% G, consistente com a natureza deste gene, em outros insetos, de apresentar altas taxas de A-T (Simon *et al.*, 1994).

Figura 1: Exemplos dos fragmentos do gene mitocondrial COI amplificados. **M:** Marcador GeneRuler™ DNA Ladder Mix.1 e **2:** A.sp.3 São Luis do Paraitinga (SP); **3 - 6:** A.sp.3 Salesópolis (SP); **7 e 8:** A.sp.1 Salesópolis (SP); **9:** Controle negativo.

IV.1.1. Análises de haplótipos e distância

Nas espécies do complexo foram encontrados 245 sítios variáveis e 45 haplótipos que, em alguns casos, são compartilhados por mais de uma espécie, como segue na Tabela III e IV. Destes 45 haplótipos, 30 foram descritos em *A. sp.1* (26 haplótipos específicos), cinco em *A. sp.2* (1 haplótipo específico) e dezessete em *A. sp.3* (13 haplótipos específicos). Assim, apenas 5 haplótipos (Tabela IV) descritos são compartilhados. No entanto, eles estão presentes em cerca de 44% dos indivíduos analisados. O haplótipo mais frequente nas amostras foi o H2, presente em cerca de 26% dos indivíduos e compartilhado entre as três espécies.

Tabela III: Haplótipos determinados pelo programa do DnaSPv5 a partir das sequências analisadas do complexo *fraterculus* e suas localidades. Entre parênteses quantidade de indivíduos com este haplótipo; * indica haplótipos compartilhados por mais de uma espécie

Espécie	Sítio de coleta	Nº de indivíduos	Código do haplótipo (nº de indivíduos)
<i>A. sp.1</i>	Salesópolis (SP)	4	H1(1)// H2*(1)// H3(1)// H4*(1)
	Jacareí (SP)	2	H2*(1)// H5(1)
	Botucatu (SP)	5	H2*(2)// H8*(1)// H9(1)// H10(1)
	Lorena (SP)	4	H2*(1)// H18(1)// H19(2)
	Três Rios (RJ)	4	H2*(3)//H23(1)
	Uberlândia (MG)	4	H16(1)// H24(1)// H25(1)// H26(1)
	São Luís do Paraitinga (SP)	4	H2*(1)// H6(1)// H7(2)
	Santa Isabel (SP)	5	H11*(1)// H12(1)//H13(1)// H14(1)// H15(1)
	Ibiúna (SP)	4	H11*(2)// H16(1)// H17(1)
	Jambeiro (SP)	3	H20(1)// H21(1)// H22(1)
	Piracicaba (SP)	4	H27(1)// H28(1)// H29(1)// H30(1)
<i>A. sp.2</i>	Taubaté (SP)	4	H2*(2)// H8*(1)// H32(1)
	Ubatuba (SP)	7	H2*(6)// H31*(1)
	Ilha Bela (SP)	2	H2*(1)// H4*(1)
<i>A. sp.3</i>	Salesópolis (SP)	4	H36(1)// H37(1)// H38(1)// H39(1)

	Ubatuba (SP)	5	H4*(2) // H33(1)// H34(1)// H35(1)
	São Luís do Paraitinga (SP)	7	H2*(1) // H31*(1) // H41(1)// H42(1)// H43(1)// H44(1)// H45(1)
	Jambeiro (SP)	3	H4*(1) // H11*(1) // H40(1)
A. sp. 4	Guayaquil – Equador	1	H2*(1)

Tabela IV: Haplótipos compartilhados determinados pelo programa do DnaSPv5. Entre parênteses a quantidade de indivíduos com este haplótipo.

Código do haplótipo	Espécies, sítio de coleta (nº de indivíduos)	Nº Total de indivíduos
H2	A. sp.1, Salesópolis (1)// A. sp.1, Jacareí (1)// A. sp.1, São Luis do Paraitinga (1)// A. sp.1, Botucatu (2)// A. sp.1, Lorena (1)// A. sp.1, Três Rios (3)// A. sp.2, Ubatuba (6) // A. sp.2, Taubaté (2) // A. sp.2, Ilha Bela (1) // A. sp.3, São Luis do Paraitinga (1)// A. sp.4, Equador	20
H4	A. sp.1, Salesópolis (1)// A. sp.2, Ilha Bela (1) // A. sp.3, Ubatuba (2)// A. sp.3, Jambeiro (1)	5
H8	A. sp.1, Botucatu (1)// A. sp.2, Taubaté (1)	2
H11	A. sp.1, Santa Isabel (1)// A. sp.1, Ibiúna (2)// A. sp.3, Jambeiro (1)	4
H31	A. sp.2, Ubatuba (1)// A. sp.3, São Luis do Paraitinga (1)	2

Ao todo foram descritos 40 haplótipos específicos, geralmente únicos, ou seja, encontrados em apenas um indivíduo na análise. Na Figura 2 é possível verificar que estes haplótipos são poucos divergentes entre si (Brumfield *et al.*, 2003; Stumpf, 2004), com exceção do haplótipo H1, em A. sp.1 de Salesópolis (SP), que apresenta o maior número de diferenças em relação aos demais haplótipos.

Figura 2: Número de alterações nucleotídicas entre todos os haplótipos descritos em cada região. ■ Indicam cada haplótipo e as linhas tracejadas separam as amostras populacionais. SP1= *A. sp.1*; SP2= *A. sp.2*; SP3= *A. sp.3*; Sales= Salesópolis (SP); SLP= São Luis do Paraitinga (SP); 3Rios= Três Rios (RJ).

O valor médio da diversidade haplotípica (H) para as três espécies foi de 0,93. Para *A. sp.1* o valor de H foi de 0,95, *A. sp.2* 0,54 e *A. sp.3* 0,98. Estes valores indicam a grande variação de haplótipos em cada população. A distância média encontrada entre os haplótipos de *A. sp.1*, *A. sp.2* e *A. sp.3* é de 0,021 e as médias das distâncias intraespecíficas são de 0,0127 em *A. sp.1*, 0,0027 em *A. sp.2* e 0,009 em *A. sp.3*. As médias das distâncias interespecíficas seguem na Tabela V.

Tabela V: Matriz de distância média entre haplótipos do gene mitocondrial COI nas diferentes espécies do complexo *fraterculus*. Em vermelho e itálico o menor e maior valores.

	A. sp.1	A. sp.2	A. sp.3
A. sp.1			
A. sp.2	0,011		
A. sp.3	<i>0,013</i>	0,006	
A. sp.4	0,009	<i>0,001</i>	0,005

Com essa análise, é possível verificar que as distâncias interespecíficas são menores ou iguais às intraespecíficas e que A. sp.2 e A. sp.4 apresentam a menor distância (0,001) entre si, enquanto que A. sp.1 e A. sp.3 são as mais distantes (0,013).

IV.1.2. Análises populacionais

A análise de Fst (Wright, 1969) foi realizada com o programa Arlequin, em AMOVA com teste de significância de 1023 permutações e método de distância K2P. Em análises do Fst, valores negativos indicam que há mais variação intrapopulacional do que interpopulacional nessas localidades (Stoka *et al.*, 2005 e Habib *et al.*, 2011). Assim, os valores negativos devem ser interpretados como 0, ou seja, ausência de diferenciação entre as populações (Emelianov *et al.*, 2004; Foster *et al.*, 2006). Nas análises a seguir, a magnitude de fixação genética entre os grupos foi determinada segundo a definição de Wright (1978), que caracteriza como baixa a diferenciação com valores de Fst entre 0 a 0,05, moderada o Fst entre 0,05 a 0,15, alta com Fst entre 0,15 a 0,25 e muito alta com Fst>0,25.

O valor médio de Fst encontrado quando as três espécies foram comparadas, mas consideradas como entidades distintas foi de 0,34759 (P= 0). Quando a análise foi realizada concatenando os dados das três espécies e considerando todas as amostras como pertencentes a um único conjunto, o valor médio de Fst foi de 0,16376 (P=0). Assim, a diferenciação genética entre as três espécies é considerada muito alta quando o modelo as separa como entidades independentes, indicando que este é o modelo populacional mais adequado.

Os valores encontrados para a análise de comparação par a par, entre as populações, ainda com esta estrutura, pode ser observado na Tabela VI. É

possível observar que a maioria das populações amostradas apresenta algum tipo de estruturação em relação às demais. Além disso, os valores mais altos de F_{st} foram descritos em *A.sp.1* de Piracicaba (SP), Ibiúna (SP) e Santa Isabel (SP). Em comparações interespecíficas, os valores de F_{st} médio entre *A. sp.1* e *A. sp.2* foi de 0,21 (alta estruturação, $P=0,002$), entre *A. sp.1* e *A. sp.3* foi 0,14 (estruturação moderada, $P=0,005$) e entre *A. sp.2* e *A. sp.3* foi de 0,04 (baixa estruturação, $P=0,044$).

Tabela VI: Matriz dos valores de Fst nas comparações par a par para as populações amostradas. Em azul valores ≤ 0

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1- A. sp.1- Uberlândia																	
2- A. sp.1- Botucatu	0.00																
3- A. sp.1- Piracicaba	0.22	0.59															
4- A. sp.1- Ibiúna	0.22	0.62	-0.00														
5- A. sp.1- Santa Isabel	0.16	0.50	-0.01	-0.05													
6- A. sp.1- Jacareí	-0.50	-0.16	0.23	0.27	0.09												
7- A. sp.1- Salesópolis	-0.06	-0.04	0.33	0.35	0.31	-0.28											
8- A. sp.1- Jambeiro	-0.12	-0.03	0.32	0.34	0.28	-0.38	-0.10										
9- A. sp.1- São Luis do Paraitinga	-0.02	-0.11	0.53	0.56	0.44	-0.20	-0.07	-0.06									
10- A. sp.1- Lorena	0.30	0.01	0.86	0.91	0.71	0.34	0.03	0.13	0.13								
11- A. sp.1- Três Rios	0.28	-0.02	0.87	0.91	0.71	0.32	0.00	0.11	0.11	0.13							
12- A. sp.2- Ilha Bela	0.07	-0.22	0.83	0.90	0.63	0.00	-0.24	-0.17	-0.11	0.11	0.00						
13- A. sp.2- Ubatuba	0.44	0.08	0.92	0.95	0.79	0.56	0.17	0.31	0.25	0.27	0.08	0.27					
14- A. sp.2- Taubaté	0.22	-0.00	0.72	0.75	0.62	0.12	-0.00	0.07	0.03	0.05	0.01	-0.20	0.13				
15- A. sp.3- Ubatuba	-0.01	-0.12	0.60	0.63	0.51	-0.13	-0.07	-0.01	-0.05	0.04	0.01	-0.31	0.13	0.03			
16- A. sp.3- Salesópolis	0.26	0.21	0.63	0.65	0.57	0.12	0.04	0.13	0.20	0.24	0.22	-0.03	0.39	0.16	0.18		
17- A. sp.3- São Luis do Paraitinga	0.32	0.03	0.80	0.82	0.71	0.31	0.10	0.22	0.12	0.05	-0.05	-0.25	0.04	0.03	0.04	0.21	
18- A. sp.3- Jambeiro	-0.27	-0.17	0.46	0.50	0.35	-0.50	-0.18	-0.21	-0.15	0.15	0.12	-0.23	0.33	0.06	-0.26	0.10	0.12

A seguir foi feito o teste de desvio de neutralidade de Tajima (1989) com o programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010) e os valores estão na Tabela VII. Estes dados indicam que o DNA mitocondrial das espécies do complexo não está evoluindo de maneira neutra e sim que apresenta excesso de polimorfismos únicos recentes, o que pode indicar expansão populacional ou seleção (Rogers e Harpending, 1992; Tajima, 1989).

Tabela VII: Valores encontrados no teste de neutralidade para as três espécies do complexo no Brasil.

Teste de desvio de neutralidade			
	A. sp.1	A. sp.2	A. sp.3
D de Tajima	-111.071	-0.39798	-0.35322
Valor P	0.00200	0.02400	0.02600

O teste de expansão populacional foi realizado com a distribuição “mismatch”, descrito por Slatkin e Hudson (1991) e Rogers e Harpending (1992) com o programa DnaSPv5 (Librado e Rozas, 2009). A estatística do teste foi feita com a análise de “raggedness” (r) descrita por Harpending *et al.* (1993) no programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). Os valores de r foram de 0,006 ($P= 1,000$) para A. sp.1, 0,38626 ($P=0,946$) para A. sp.2 e de 0,017 ($P= 0.579$). As curvas geradas pela distribuição nas análises de “mismatch” (Figura 3) foram multimodais ou bimodais.

Segundo Harpending *et al.* (1993, 1994), populações em expansão apresentam valores de r menores que populações estáveis e curvas de distribuição “mismatch” unimodais, pois a frequência de um único haplótipo aumenta no evento de expansão. Curvas multimodais ou bimodais com altos valores de r são encontradas em populações estáveis (Slatkin e Hudson, 1991; Rogers e Harpending, 1992; Harpending *et al.*, 1993; 1994).

As análises de expansão populacional revelaram o valor de r esperado em populações em expansão, mas as curvas de distribuição foram multimodais. Castoe *et al.* (2007) e Nuñez *et al.* (2011) discutem este paradoxo e afirmam que dados como este, em geral, não indicam forte evidência de expansão populacional recente. No entanto, os autores também discutem que, a distribuição multimodal no teste de “mismatch” pode ser gerada em populações que sofreram expansão populacional recente, mas estão sujeitas a

altas taxas de migração e/ou sofreram redução populacional histórica (Castoe *et al.*, 2007 e Nuñez *et al.*, 2011).

Figura 3: Distribuição par a par de diferenças genéticas (distribuição mismatch) das diferentes espécies. Os valores esperados são para populações em equilíbrio sem recombinação, com tamanho constante.

Outro fator que pode produzir resultados negativos significantes nos testes de desvio de neutralidade é a seleção (Tajima, 1989). Para testar esta hipótese foi estimada a relação entre mutações não sinônimas e sinônimas considerando-se os sítios disponíveis (K_a/K_s , Li, 1993), com o programa DnaSPv5 (Librado e Rozas, 2009). Os valores são de 0,081; 0,367 e 0,249 para A. sp.1, A. sp.2 e A. sp.3 respectivamente. Estes são valores baixos e indicam que há mais mutações sinônimas do que não sinônimas. Para testar a hipótese de seleção purificadora foi realizado o teste Z de seleção (Nei e Kumar, 2000) com o programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Com este teste, a probabilidade de se rejeitar a hipótese de estrita neutralidade em favor da hipótese alternativa de seleção purificadora, foi significativa com valores de $P=0,000$ para A. sp.1, $P=0,011$ para A. sp.2 e de $P=0,00$ para A. sp.3. Este

cenário indica que a molécula de DNA mitocondrial está sob seleção purificadora direta ou indireta, como já descrito para diversas espécies (Nachman *et al.*, 1996; Gerber *et al.*, 2001; Rand, 2001; Ballard e Whitlock, 2004; Hurst e Jiggins, 2005; Bazin *et al.*, 2006).

IV. 1.3. Análises de introgressão da molécula mitocondrial

Os haplótipos compartilhados por mais de uma espécie do complexo são H2; H4; H8; H11 e H31(Tabela IV). Estes haplótipos podem ser compartilhados por ter havido um processo de introgressão recente ou por ser uma herança ancestral remanescente (plesiomorfia). A Figura 4 mostra os haplótipos compartilhados e as possíveis hipóteses de introgressão, levando-se em consideração a distribuição geográfica.

Além disso, não foram encontradas diferenças fixadas entre as espécies, com as análises de divergência entre as populações gerada pelo programa DnaSPv5 (Librado e Rozas, 2009). A ausência de diferenças fixadas mostra a impossibilidade de identificação das espécies com o mtDNA e corrobora a hipótese de introgressão.

Figura 4: Hipóteses sobre possíveis eventos de introgressão ou migração entre os haplótipos compartilhados. As duplas setas indicam que não se pode inferir a “direção da introgressão” com os dados atuais. As espécies são indicadas com a forma das figuras e as regiões geográficas com as linhas fechadas ou pontilhadas.

IV.1.4. Análises filogenéticas

O programa jModelTest 0.1 (Posada, 2008), baseado nos dados obtidos com o sequenciamento, indicou o modelo TrN+G para as análises filogenéticas em ML. A árvore (Figura 5) apresenta dois ramos principais: um deles formado pela maioria dos haplótipos de *A. sp.1*, com apenas duas amostras de *A. sp.3* inclusas, uma de Jambeiro (SP) e uma de Ubatuba (SP) e, o outro ramo, congregando as demais amostras de todas as espécies.

No ramo predominante de *A. sp.1*, há localidades que não são representadas no outro agrupamento (Ibiúna –SP e Piracicaba –SP) e ambas representam regiões fora da zona de simpatria no Vale do Paraíba. No entanto, Botucatu (SP) e Uberlândia (MG), que também não estão em zonas de simpatria, estão separadas nos dois ramos indicando que é necessária a extensão das análises para regiões mais distantes do Vale do Paraíba para que o cenário seja visualizado com mais clareza.

A análise dos “bootstraps” com valores menores de 50% foram omitidas e o valor encontrado na separação dos dois grandes clados de amostras brasileiras é de 100%. Uma das amostras de *A. sp.1* de Uberlândia (MG - haplótipo H24) apesar de se separar do grupo predominante desta espécie, também se encontra em um ramo distinto dos outros haplótipos com “bootstrap” de 98%. O haplótipo H14, encontrado em *A. sp.1* de Santa Isabel (SP), por sua vez, se distâcia do grupo principal de *A.sp.1* com “bootstrap” de 77%, mesmo sendo separado do grupo que reúne as outras espécies no nó anterior. Estes dados demonstram que estas amostras possuem diferenças moleculares significativas em relação ao agrupamento principal em que se encontram.

Figura 5: Árvore filogenética inferida a partir dos haplótipos baseados em fragmentos do gene COI das amostras analisadas neste trabalho. SLP= São Luis do Paraitinga (SP); Bot= Botucatu (SP); Taub = Taubaté (SP); Sales = Salesópolis (SP); Uba= Ubatuba (SP); Jaca = Jacareí (SP); 3Rios= Três Rios (RJ); IBe= Ilha Bela (SP); Jamb= Jambeiro (SP); Uber= Uberlândia (MG); Sisa= Santa Isabel (SP); Ibi= Ibiúna (SP); Pira= Piracicaba (SP). Em negrito os haplótipos compartilhados por mais de uma espécie. * amostras de *A. sp.3* no ramo predominante de *A. sp.1*.

A análise de haplótipos, com programa Network 4.6 (fluxus-engineering.com), mostra a rede de haplótipos com formato de “altere” (Figura 6), com a formação de duas estrelas conectadas por um longo ramo (Avice, 2000) e confirma a existência de dois agrupamentos de haplótipos que correspondem aos principais ramos observados na filogenia. O haplótipo mais frequente é o H2 e existe nas quatro espécies do complexo. Os haplótipos menos frequentes se distribuem em torno dos haplótipos mais frequentes nos grupos 1 e 2 formando agrupamentos em formato de estrela, o que pode indicar expansão populacional (Forster *et al.*, 2001). A distribuição dos haplótipos parece não se correlacionar com a localização geográfica destas populações assim como na árvore filogenética. Além disso, nos dois grupos, os haplótipos mais divergentes se encontram nas regiões de simpatria do Vale do Paraíba.

Figura 6: Rede de haplótipos baseada em fragmentos do gene COI mitocondrial. Números em vermelhos indicam os sítios polimórficos de um haplótipo à outro.

IV. 2. Análise ampliada do complexo *fraterculus*

Para uma análise ampliada do complexo *fraterculus*, outras sequências do gene mitocondrial COI de *A. fraterculus* (*sensu lato*) de outras localidades do Brasil e de outros países da América obtidas por Smith-Caldas *et al.* (2001), foram utilizadas em uma análise conjunta com as amostras obtidas neste trabalho (Tabela I; Anexo I). Para que os fragmentos obtidos neste trabalho pudessem ser comparados com os dados gerados por Smith-Caldas *et al.* (2001), o tamanho das sequências foi reduzido para 769pb, região de congruência entre as amostras, uma vez que o fragmento sequenciado e amplificado por estes autores é de 808pb. A redução das sequências para a região de congruência diminuiu o número de sítios variáveis (de 245 para 158) e consequentemente, o número de haplótipos descritos nas amostras brasileiras obtidas neste trabalho (de 45 para 31). Metade das sequências de Smith-Caldas *et al.* (2001) compartilharam haplótipos com os indivíduos coletados neste trabalho e a outra metade apresentou haplótipos diferentes. Ao total foram descritos 39 haplótipos (Tabela VIII).

Com a análise conjunta das sequências foi realizada a análise de haplótipos (Tabela VIII) e a árvore filogenética (Figura 7). Essa foi gerada pelo método de verossimilhança com o modelo de TrN+I, conforme indicado pelo programa jModelTest 0.1 (Posada, 2008).

Tabela VIII: Haplótipos gerados pelo programa do DnaSPv5 a partir das sequências analisadas da espécie nominal *A. fraterculus*. * indica haplótipos compartilhados.

Espécie	Sítio de coleta- nº de acesso	Haplótipo (nº de indivíduos)
A. sp.1	Salesópolis (SP)	H1(1)// H2*(2)// H3*(1)
	Jacareí (SP)	H2*(1)// H4(1)
	Botucatu (SP)	H2*(3)// H7(1)// H8(1)
	Lorena (SP)	H2*(2)// H16(2)
	Três Rios (RJ)	H2*(4)
	Uberlândia (MG)	H3*(1)// H14(1)// H19(1)// H20(1)
	São Luís do Paraitinga (SP)	H2*(1)// H5(1)// H6(2)
	Santa Isabel (SP)	H9*(1)// H10(1)// H11(1)// H12(1)// H13(1)
	Ibiúna (SP)	H9*(2)// H14(1)// H15(1)

	Jambeiro (SP)	H9*(1)// H17(1)// H18(1)
	Piracicaba (SP)	H9*(1)// H21(1)// H22(1)// H23(1)
A. sp.2	Taubaté (SP)	H2*(3)// H24(1)
	Ubatuba (SP)	H2*(7)
	Ilha Bela (SP)	H2*(1)// H3*(1)
A. sp.3	Salesópolis (SP)	H26(1)// H27(1)// H28(1)// H29(1)
	Ubatuba (SP)	H3*(3)// H9*(1)// H25(1)
	São Luís do Paraitinga (SP)	H2*(3)// H3*(2)// H30(1)// H31(1)
	Jambeiro (SP)	H3*(2)// H9*(1)
A. sp. 4	Guayaquil – Equador	H2*
A. fraterculus s.l. (Smith-Caldas <i>et al.</i> , 2001)	Janaúba (MG) – AF420614	H2*
	Santo Amaro (BA) – AF420640	H2*
	Chapecó (SC) – AF420612	H3*
	Linhares (ES) – AF420638	H3*
	Vacaria (RS) – AF420616	H9*
	Caçador (SC) – AF420636	H9*
	São José da Bela Vista (SP) – AF420642	H9*
	Monte Alegre do Sul (SP) – AF420615	SH2
	Palin (Guatemala) – AF20613	SH1
	Tucumán (Argentina) – AF420630	H9*
	Caracas (Venezuela) – AF420615	SH3
	La Mesa (Colômbia) – AF420631	SH4
	Mérida (Venezuela) – AF420632	SH5
	Chiapas (México) – AF420637	SH6
	Puntarenas (Costa Rica) – AF420637	SH7
	Sevilla (Colômbia) – AF420641	SH8

Todas as amostras brasileiras se agrupam em dois ramos, da mesma forma que na análise anterior deste trabalho, sendo que as amostras da Argentina (grupo 2- H9) e do Equador (grupo 1- H2) também se reúnem nestes grupos. Pode-se notar ainda que há a formação de pelo menos três grupos de haplótipos mitocondriais dentro da espécie nominal *A. fraterculus*, além dos dois com amostras brasileiras. Um grupo é formado pelas amostras do México

e da Costa Rica, grupo este filogeneticamente mais próximo das amostras brasileiras, outro grupo com amostras da Guatemala e Venezuela e um mais basal com os haplótipos colombianos e um da Venezuela.

Figura 7: Filogenia inferida a partir dos haplótipos baseados em fragmentos do gene COI para espécies do complexo *fraterculus*. As cores indicam os diferentes clados formados: Verde- haplótipos do Brasil e Equador; Laranja- haplótipos do Brasil e Argentina; Roxo- haplótipos da Colômbia e Venezuela; Azul- haplótipos da Guatemala e Venezuela; Vermelho- haplótipos da Costa Rica e México.

Os haplótipos de *A. fraterculus* s.l. da Colômbia se separam dos demais no primeiro nó da árvore com “bootstrap” de 95% e formam subgrupos com “bootstrap” de 100%, separando a amostra de La Mesa (SH4), localizada cerca de 300 metros de altitude abaixo das outras regiões. As regiões amostradas na Venezuela possuem uma grande diferença de altitude, Caracas (SH3) está à 6m de altitude e Mérida (SH5) à 1700m, e os haplótipos se agrupam em ramos distintos da árvore. No entanto, ambos formam subgrupos independentes em seus clados com “bootstrap” de 78% em relação aos haplótipos colombianos e

de 65% do haplótipo guatemalteco. As amostras do México e Costa Rica se separam do grupo 1 de haplótipos brasileiros com “bootstrap” de 52% e, entre si, com 99%. Estes dados demonstram que há polimorfismo dentro das áreas amostradas, ainda que os haplótipos se agrupem em clados principais, e indica a necessidade de ampliar a amostragem destas localidades para correta interpretação da diversidade destes ramos.

IV. 3. Análise do grupo infragenérico *fraterculus*

A análise filogenética do grupo *fraterculus* foi realizada anteriormente por Smith-Caldas *et al.* (2001), mas como as espécies do complexo *fraterculus* não estavam caracterizadas, procuramos no presente estudo refazer esta análise para compreender melhor as relações filogenéticas da molécula mitocondrial. A análise filogenética foi realizada com o modelo TrN+I indicado pelo programa jModelTest 0.1 (Posada, 2008) e os haplótipos utilizados para as amostras de *A. fraterculus* estão descritos na Tabela VIII; na Tabela II estão descritas as demais espécies do gênero *Anastrepha* que foram utilizadas.

A Figura 8 mostra a filogenia do grupo *fraterculus* e é possível observar que, de acordo com o gene mitocondrial COI o complexo *A. fraterculus* não é monofilético, como já descrito por Smith-Caldas *et al.* (2001). Basicamente os diferentes grupos de haplótipos formados na Figura 7 se mantêm nesta análise, intercalados por amostras de outras espécies de moscas-das-frutas que também não são monofiléticas, como por exemplo, *A. obliqua*.

O grupo formado principalmente por amostras de *A. sp.1*, não reúne outras espécies de *Anastrepha*. No entanto, o outro ramo que agrupa as demais amostras brasileiras, se encontra proximamente relacionado às amostras de *A. obliqua* e *A. sororcula*.

Figura 8: Filogenia do grupo *fraterculus* baseada no gene COI.

As amostras de *A. fraterculus* s.l. da Guatemala e Venezuela, que se separavam na análise anterior com bootstrap de 65%, nesta análise ficam em clados relacionados, mas diferentes e intercalados por outras espécies. Assim, com o haplótipo da Guatemala se agrupam as espécies *A. bahiensis* e *A. distincta* e com o haplótipo venezuelano as amostras de *A. zenildae*.

V. Discussão Geral e Conclusões

Estudos com outros marcadores indicaram que as populações de *Anastrepha* apresentam baixos valores de variabilidade genética, em relação a outros dípteros, como discutido nos trabalhos de Malavasi e Morgante (1982) e Selivon (1996). Existem várias hipóteses para explicar os baixos valores relatados, uma das quais propõe que espécies que ocupam ambientes heterogêneos ou, como no caso de *Anastrepha*, exploram um grande número de hospedeiros apresentam menor variabilidade devido à seleção de alelos cujos produtos atuam em vários substratos (Valentine, 1976; Malavasi e Morgante, 1983). Outra hipótese destaca a influência da redução no tamanho populacional (efeito gargalo) à que as populações de *Anastrepha* estão sujeitas, que pode levar à perda de alelos com redução da variabilidade.

A redução do tamanho efetivo de uma população, além de levar a perda de diversidade, também influencia o tempo de fixação de mutações, pois este é dependente do tamanho populacional (Lynch, 2007). Deste modo, mutações neutras em deriva dificilmente são fixadas, mas sua taxa de fixação é diretamente proporcional ao tamanho populacional ($1/N$). Assim quanto menor o tamanho populacional maior a probabilidade de fixação de uma nova mutação neutra ao acaso (Lynch, 2007). Logo, o gargalo sofrido periodicamente por populações naturais de *Anastrepha* pode levar a perda de diversidade, mas também facilita a fixação de haplótipos diferentes em populações distintas contribuindo para a diferenciação entre as espécies.

Reduções populacionais históricas também podem gerar a distribuição multimodal encontrada no teste de “mismatch”, apesar de populações em expansão apresentarem uma curva de distribuição unimodal (Castoe *et al.*, 2007 e Nuñez *et al.*, 2011). Logo, o efeito gargalo das populações deve gerar a distribuição multimodal da curva, pois o fenômeno de redução populacional ocorre localmente, levando ao aumento da frequência de haplótipos diferentes dentro da mesma espécie e à curva multimodal na distribuição de diferenças par a par (análise de *mismatch*). Assim, explica-se a discrepância encontrada entre o teste de “mismatch” e o valor de r , sugerindo-se a hipótese de expansão recente, como indicado pelo teste de desvio de neutralidade.

As análises de haplótipos também suportam a hipótese de expansão, mostrando que existe uma grande diversidade de haplótipos ($H= 0,93$), 89% dos quais são representados por polimorfismos únicos que aparecem em apenas um indivíduo. As sequências são pouco distantes entre si e, frequentemente dentro da mesma localidade, todos os indivíduos apresentaram haplótipos diferentes. Além disso, os haplótipos que ocorreram no maior número de indivíduos, não são espécie-específicos e sim compartilhados (como H2 e H4, por exemplo). Assim, a molécula mitocondrial destas espécies se mostra variável. Porém, esta variação é representada por haplótipos com baixa frequência nas populações e não ocorrem diferenças fixadas entre as espécies.

A rede de haplótipos sugere o padrão filogeográfico de categoria II descrito por Avise (2000). Este padrão pode ocorrer, como é bastante frequente com DNA mitocondrial, indicando zonas de contato secundário entre populações que divergiram. Assim uma hipótese possível para explicar o padrão de distribuição dos haplótipos mitocondriais encontrado, é que as espécies tenham divergido, mas o contato secundário tenha gerado a introgressão da sequência com posterior expansão na frequência de linhagens mitocondriais. Sendo que este processo não necessariamente representa expansão populacional da espécie, mas sim a expansão molecular dos haplótipos mitocondriais, que pode ter ocorrido após um evento de introgressão. Considerando-se ainda a rede de haplótipos, é possível verificar que os haplótipos H11 (no grupo 2) e H2 (no grupo 1) são os haplótipos centrais das estrelas, o que segundo Avise (2000) indica que estes são os haplótipos representantes da origem da expansão.

Na Figura 4 estão descritas hipóteses sobre possíveis formas de introgressão dos haplótipos mitocondriais compartilhados, sendo que o haplótipo H31 é o único que ocorre em espécies distintas que estão em localidades diferentes. O esquema é apenas uma indicação do que pode ter ocorrido com base nos dados e distribuição geográfica das sequências. No entanto, é necessário considerar que alguns dos haplótipos podem ser compartilhados por polimorfismo ancestral ou serem gerados por convergência de mutações em sequências relacionadas e não necessariamente por um novo processo de introgressão.

Mesmo com o compartilhamento de haplótipos, as análises de *Fst* mostram uma alta estruturação entre as espécies. Assim é possível concluir que o polimorfismo mitocondrial, provavelmente gerado pela alta taxa mutacional do marcador e pela expansão ocorrida, eleva os valores de *Fst* médio (devido aos haplótipos únicos e altos valores de diversidade haplotípica).

A análise de *Fst* par a par (Tabela VI) mostra que as populações também possuem certa estrutura interpopulacional, o que é esperado pela grande variedade de haplótipos. Os valores médios de *Fst* entre as espécies indicam que a maior estrutura populacional está entre *A. sp.1* e *A. sp.2* e, que entre *A. sp.2* e *A. sp.3* há baixa estruturação. A distância média entre essas espécies (0,06) também foi menor do que entre *A. sp.1* e *A. sp.2* (0,011). Estes resultados indicam que, *A. sp.2* e *A. sp.3* são as espécies mais proximamente relacionadas e *A. sp.1* e *A. sp.2* as mais distantes, resultados também observados com as análises de similaridade de Prezotto (2008).

Os resultados obtidos com os testes de seleção indicam que este processo é outro fator importante na história evolutiva da molécula mitocondrial do complexo *A. fraterculus*. A seleção purificadora, assim como os gargalos, gera perda de diversidade por eliminar rapidamente mutações deletérias (Hamilton, 2009). Além disso, é necessário considerar que as áreas de distribuição das amostras utilizadas são relativamente próximas e que as características biológicas destas espécies, quanto ao uso de hospedeiro, são similares. Isto pode sugerir que o mtDNA esteja sob seleção semelhante nas diferentes espécies do complexo, o que inclusive facilitaria a expansão de um único haplótipo mitocondrial introgrado (Rand, 2001).

Em artrópodes, um fator importante na análise da molécula mitocondrial são as interações destes animais com simbioses que causam incompatibilidade citoplasmática (Hurst e Jiggins, 2005). A *Wolbachia*, por exemplo, é maternalmente transmitida pelo citoplasma dos ovos onde também está o mtDNA, levando ao denominado efeito “carona”. Este efeito facilita a expansão de linhagens mitocondriais concomitantemente às linhagens da bactéria (Ballard e Whitlock, 2004). Como resultado, infecções por *Wolbachia* levam ao aumento de um haplótipo mitocondrial e a perda de outros, o que pode explicar a alta frequência do haplótipo H2, em comparação aos demais e a provável expansão ocorrida.

Uma vez que infecções por *Wolbachia* já foram descritas no complexo *fraterculus* (Selivon *et al.*, 2002; Mascarenhas, 2007; Coscrato *et al.*, 2009), o mesmo fenômeno encontrado em algumas espécies de *Drosophila* pode explicar os resultados obtidos neste trabalho pela ação destes microorganismos.

Convencionalmente, comparações entre a genealogia do DNA nuclear e mitocondrial fornecem evidências dos processos evolucionários envolvidos nas filogenias, pois os processos de recombinação e retrocruzamento afetam os genes e genomas diferentemente e podem levar a incongruências filogenéticas (Virgilio *et al.*, 2008). Assim, as evidências de introgressão da molécula mitocondrial, em espécies distintas e proximamente relacionadas, são baseadas principalmente na divergência das genealogias nucleares e mitocondriais, em que as primeiras indicam que as espécies são entidades distintas e as segundas agrupam diferentes espécies (Ballard e Whitlock, 2004).

As análises filogenéticas das espécies do complexo *fraterculus* baseadas no marcador nuclear espaçador de DNA ribossômico ITS1, realizadas por Prezotto (2008), geraram uma árvore filogenética em que *A. sp.1*, *A. sp.2* e *A. sp.3* se agrupavam em clados distintos. Tal agrupamento permitiu a separação das espécies do complexo, ainda que o tamanho do espaçador tenha sido pouco variável e que o índice de similaridade entre as amostras no Brasil tenha sido acima de 88%. O autor sugere que esta baixa divergência ocorra devido ao provável pouco tempo de diferenciação entre as espécies, como já foi sugerido em outros trabalhos (Smith-Caldas, 2001; Selivon *et al.*, 2005).

Por apresentar uma taxa mutacional maior que o marcador ITS1, o marcador mitocondrial COI se mostra bastante efetivo em estudos de especiação recente (Avise, 2009). No entanto, nas análises filogenéticas baseadas neste marcador, foi possível observar um cenário diferente do descrito no trabalho de Prezotto (2008), mas esperado segundo a literatura (Ballard e Whitlock, 2004). A árvore gerada com os haplótipos encontrados (Figura 5) apresentou dois ramos principais, um deles mais representativo de *A. sp.1* e o outro ramo com todas as espécies. Consequentemente, não há evidências para a separação segura das espécies do complexo com a

molécula mitocondrial, como é confirmado com a rede de haplótipos. Assim, estes dados condizem com a hipótese de introgressão mitocondrial.

Virgilio *et al.* (2008) ao analisar espécies do gênero *Ceratitis* com os marcadores 16S, ND6, COI, ITS1 e o gene *period* verificou que, apesar dos dados moleculares, de uma forma geral, não corroborarem totalmente a classificação das espécies baseada em dados morfológicos, os dados mitocondriais (em especial os marcadores ND6 e COI) apresentaram diferenças intraespecíficas maiores que as interespecíficas e indicaram a ocorrência de um processo de hibridização introgressiva. Tais dados permitiram gerar a hipótese de que as espécies poderiam, apesar de serem unidades distintas, ocasionalmente se cruzar e induzir a troca de genes. Situação semelhante à observada no presente trabalho.

Como cruzamentos em laboratório entre as diferentes espécies do complexo *fraterculus* são possíveis (Selivon *et al.*, 1999; 2005; Vera *et al.*, 2006; Cáceres *et al.*, 2009), na natureza pode haver introgressão de haplótipos mitocondriais que, como verificado por Hurst e Jiggins (2005) em outras espécies, se tornam compartilhados sem que o DNA nuclear indique o mesmo processo. Isto ocorre uma vez que a hibridização é pouco frequente para induzir à homogeneização do genoma nuclear. Em amostras brasileiras de *A. fraterculus s. l.*, os dados de Santos (1994) já indicavam a possibilidade de ocorrência deste evento com análises de RFLP do DNA mitocondrial.

A falta de diferenças fixadas, com ausência de mutações que caracterizem a espécie, reflete-se na filogenia e impossibilita a distinção entre as espécies do complexo *fraterculus* no Brasil, através do marcador mitocondrial, mesmo que existam haplótipos espécie-específicos. Assim, a formação dos dois grandes clados com valor de “bootstrap” de 100% corrobora com o trabalho de Smith-Caldas *et al.* (2001) indicando que a espécie *A. fraterculus s.l.* não forma um grupo monofilético.

Quando somada às análises, sequências de *A. fraterculus s.l.* de locais distantes da região de simpátria do Vale do Paraíba (Smith-Caldas *et al.*, 2001), além das regiões de alopatria amostradas, é possível verificar que a topologia geral da filogênia das amostras brasileiras não se altera, indicando que mesmo populações distantes da zona de simpátria no Brasil apresentam haplótipos mitocondriais semelhantes. Além disso, com as demais amostras de

outras regiões da América é possível verificar que os haplótipos mitocondriais dentro do complexo *fraterculus* formam, no mínimo, cinco diferentes clados. Destes, dois representam as amostras brasileiras, um combina amostras do México e Costa Rica – que é mais próximo dos grupos brasileiros-, outro combina as sequências da Guatemala e Venezuela (de baixa latitude), e um combina os indivíduos da Colômbia e Venezuela (de alta altitude). A amostra da Argentina se encontra no grupo formado principalmente por amostras de A.sp.1 e a do Equador se agrupa no outro clado brasileiro.

É necessário notar que estes grupos de haplótipos provavelmente não representam o número de espécies crípticas presentes nas regiões amostradas e sim uma subestimativa deste valor. Pois além de haver fortes evidências de introgressão da molécula mitocondrial entre as espécies do complexo, os clados principais se dividem em ramos diferentes com valores de “bootstraps” altos. As evidências geradas pelo marcador nuclear ITS1, por exemplo, indicam a existência de quatro clados principais na América Latina dentro dos quais poderiam existir, no total, mais de dez espécies no complexo (Prezotto, 2008). Já os dados das análises multivariadas de Hernández-Ortiz *et al.* (2012) demonstram a existência de sete grupos morfotípicos distintos dentro do complexo. Além disso, com esta análise foi possível verificar mais detalhadamente a relação da amostra Argentina com a amostra do sul do Brasil encontradas em 2001 (Smith-Caldas, 2001). A amostra em questão se mostrou relacionada com um dos grupos de haplótipos brasileiros representado principalmente por A. sp.1 corroborando os dados de diversos autores (Selivon *et al.*, 2005; Basso *et al.*, 2003 ; Alberti *et al.*, 2008; Cáceres *et al.* 2009; Prezotto *et al.*, 2008; Hernández-Ortiz *et al.*, 2012), de que as populações da Argentina e do sul do Brasil correspondem a uma única entidade que, por sua vez, provavelmente corresponde à A. sp.1.

A filogenia gerada pelas amostras utilizadas neste trabalho e pelos dados de Smith-Caldas *et al.* (2001) para outras espécies do grupo infragenérico *fraterculus*, mantém basicamente a topologia e os clados já demonstrados em 2001. Estas análises indicam as semelhanças e relações entre as sequências por agrupar espécies diferentes, que algumas vezes, formam grupos não monofiléticos. Como a *A. obliqua*, por exemplo, que se distribui em dois clados de haplótipos mitocondriais distintos que são

compartilhados com as amostras de *A. sororcula* e *A. fraterculus*. Isto pode sugerir que os morfotipos de certas espécies tenham surgido mais de uma vez na história evolutiva do grupo *fraterculus* ou, em uma explicação mais parcimoniosa, que houve introgressão mitocondrial dentro do grupo entre espécies proximamente relacionadas.

Uma possibilidade que explicaria os resultados obtidos é levantada por diversos autores (McPheron *et al.*, 1999; Smith-Caldas, 2001; Boykin *et al.*, 2006) e sugere que: como a história do complexo e do grupo *fraterculus* é recente - como indicado por diversos marcadores, com pouca distância entre as espécies (Selivon *et al.*, 2005; Prezotto 2008) - é possível que, por conta da seleção purificadora e pela perda de diversidade causada por gargalos populacionais, a molécula mitocondrial ainda não tivesse tempo evolutivo suficiente de fixar haplótipos que diferenciasssem as espécies. No entanto, como o marcador nuclear e outras características biológicas das espécies já se diferenciaram o suficiente para a separação destas, seria pouco provável que o marcador mitocondrial, bem conhecido por esclarecer processos evolutivos recentes, ainda não houvesse fixado nenhuma diferença.

Uma vez que as três espécies já se encontram bem caracterizadas (Selivon e Perondini, 1998; Selivon *et al.*, 2004, 2005; Prezotto 2008), as análises descritas com o marcador mitocondrial, apesar de não permitirem a separação segura das espécies crípticas do complexo *fraterculus* no Brasil, ainda que estas espécies sejam distintas, trazem dados importantes para a compreensão das relações evolutivas entre elas.

VI. Resumo

A família Tephritidae congrega várias espécies de moscas-das-frutas que utilizam frutos como substrato alimentar no estágio larval, adquirindo o status de inseto-praga quando esses frutos são de valor comercial. O gênero *Anastrepha* é endêmico do Continente Americano e compreende cerca de 212 espécies descritas, das quais 109 ocorrem no Brasil. A espécie nominal *Anastrepha fraterculus* representa um complexo de espécies crípticas e se encontra distribuída pela Região Neotropical e sul dos Estados Unidos. No Brasil, através do estudo de diversas características biológicas e do marcador molecular ITS-1 (espaçador ribossômico nuclear), identificou-se a existência de três espécies crípticas no complexo *fraterculus*, a *Anastrepha* sp.1 *affinis fraterculus*, *A. sp.2 aff. fraterculus* e *A. sp.3 aff. fraterculus*. Marcadores gênicos presentes no DNA mitocondrial, como o gene *cytochrome oxidase I* (COI), são ferramentas amplamente utilizadas em análises filogenéticas, pois esta molécula apresenta características distintas do DNA nuclear, como o fato de possuir herança predominantemente materna, apresentar ausência ou baixíssima taxa de recombinação na maioria dos táxons, além de altas taxas mutacionais. Estas características possibilitam a obtenção de dados importantes na interpretação das relações entre as espécies. Amostras do complexo *fraterculus* (*A. sp.1*, *A. sp.2*, *A. sp.3*) de 14 localidades (média de 5 indivíduos / localidade) no sudeste do Brasil, uma amostra de *A. sp.4* do Equador e dois grupos externos (*A. grandis* e *A. striata*) foram utilizados. Fragmentos de 1139bp do gene COI foram amplificados e sequenciados, 45 haplótipos foram identificados: 30 em *A. sp.1*, 5 em *A. sp.2* e 17 em *A. sp.3*. A distância média entre as espécies foi de 0,021 e o *Fst* médio foi 0,347 indicando estruturação populacional muito alta e pequena distância entre os haplótipos, que não apresentaram diferenças fixadas entre as espécies. Os testes de desvio de neutralidade apresentaram valores significativamente negativos. Os testes de seleção evidenciaram a atuação de seleção purificadora com baixos valores de *Ka/Ks* e significância no Z-teste de seleção. A análise filogenética mostrou fortes evidências de introgressão e não separou as diferentes entidades em clados distintos. Houve a formação de dois ramos principais, um constituído quase que exclusivamente por amostras de *A. sp.1*, e apenas duas amostras de *A. sp.3*, e outro que reuniu todas as espécies do complexo. Os dois principais grupos de haplótipos também foram visualizados na rede de haplótipos que mostrou indícios de expansão populacional. Quando somado ao estudo sequências depositadas em bancos de dados por outros

autores, a espécie nominal *A. fraterculus* apresentou em sua distribuição 5 grupos de haplótipos mitocondriais. Dois deles ocorrem no Brasil, um com amostras do México e Costa Rica, um na Guatemala e Venezuela (baixa latitude) e um com indivíduos da Colômbia e Venezuela (alta latitude), sendo que os grupos Brasileiros também reuniram amostras da Argentina e do Equador. Assim, as sequências de COI não permitem a caracterização das entidades do complexo *fraterculus* apesar de indicar a estruturação populacional e a hipótese mais provável é a de que tenha havido introgressão da molécula mitocondrial entre as espécies do complexo com posterior expansão.

VII. Abstract

The Tephritidae family comprises fruit flies species whose larvae feed and develop in fruits, many of which are commercial varieties and thus the species assume economic significance. *Anastrepha* genus is distributed throughout the Neotropical region and Southern United States. Analyses of biological characteristics and of the internal transcribed spacer (ITS-1) of the nuclear ribosomal DNA allowed the characterization of three cryptic species of the *fraterculus* complex in Brazil: *Anastrepha* sp.1 *affinis fraterculus*, *Anastrepha* sp.2 *aff. fraterculus* and *Anastrepha* sp.3 *aff. fraterculus*. Mitochondrial markers as gene *cytochrome oxidase I* (COI) are largely used in phylogenetic analyses because they have maternal inheritance, none or low recombination and high mutation rates compared to the nuclear DNA. Hence, analyses of the complex based in this marker will offer a divergent perspective from nuclear DNA for inferences on the evolutive relationships between different species. Samples from the *fraterculus* complex (*A. sp.1*, *A. sp.2*, *A. sp.3*) from 15 localities (average of 5 individuals/ locality) in southeastern Brazil, one sample of *A. sp.4* from Ecuador and two outgroups (*A. grandis* and *A. striata*) were employed and COI sequences of 1139bp were amplified and analyzed. We identified 45 haplotypes: 30 in *A. sp.1*, 5 in *A.sp.2* and 17 in *A. sp.3*. The mean distance between the haplotypes was 0.021 and mean F_{st} 0.347, indicating high population structure and low mitochondrial distance. The neutrality tests had significantly neutral values. The selection tests revealed the action of purifying selection with low values of K_a/K_s and significance in the Z-test selection. Phylogenetic analysis showed strong evidences of introgression and did not separate the various entities in distinct clades grouping the three species in a single branch; there was also the formation of another main branch formed almost exclusively by strains of *A. sp.1* and only two samples of *A. sp.3*. The two main groups of haplotypes were also seen in the haplotype network that showed evidence of population expansion. The analysis of the phylogenetic tree based on mitochondrial COI showed strong evidence for introgression. No fixed differences between species were found though mtDNA marker shows a lot of polymorphism. When added sequences deposited in databases by other authors the nominal species *A. fraterculus* presented in its distribution five groups of mitochondrial haplotypes, two of them in Brazil, one with samples from Mexico and Costa Rica, one in Guatemala and Venezuela and one with individuals from Colombia. The Brazilian groups also collected samples from Argentina and Ecuador. Therefore, the COI sequences do not allow the characterization of the entities of the *fraterculus* complex, although structure among the

species is shown. The most likely hypothesis is that introgression has happened in the mitochondrial molecule among the species with further expansion.

VIII. Referências Bibliográficas

- ALBERTI A.C., Calcagno G., Daidman B.O., Vilardi J.C.; 1999. Analysis of the genetic structure of a natural population of *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92: 731–736.
- ALBERTI A.C., Rodriguero M.S., Cendra P.G., Saidman B.O., Vilardi J.C.; 2002. Evidence indicating that the Argentine populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae) belong to a single biological species. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95: 505–512.
- ALBERTI A. C., Confalonieri V. A., Zandomeni R. O., Vilardi J. C.; 2008. Phylogeographic studies on natural populations of the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Genetica* 132:1–8.
- ALUJA M.; 1994. Bionomics and management of *Anastrepha*. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 1555-178.
- AMARAL P.M.; 1994. Estudo da variabilidade isozímica de sete locos em larvas de populações naturais de *Anastrepha* (Díptera: Tephritidae). Tese de Doutorado, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, USP, São Paulo.
- AN X., Tebo M., Song S., Frommer M., Raphael K. A.; 2004. The *cryptochrome* (*cry*) gene and a mating isolation mechanism in Tephritid Fruit Flies. *Genetics* 168: 2025-2036.
- ARMSTRONG K. F., Ball S. L.; 2005. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Phil. Trans. R. Soc. B.* , 360: 1813-1823.
- AUGUSTINOS A. A., Mamuris Z., Stratikopoulos E. E., D'amelio S., Zacharopoulou A. Mathiopoulos K. D.; 2005. Microsatellite analysis of olive fly populations in the Mediterranean indicates a westward expansion of the species. *Genetica* 125: 231-241
- AVISE J. C., Giblin-Davidson C., Laerm J., Patton J.C., Lansman R. A.; 1979. Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 6694-6698.
- AVISE J.C.; 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philos Trans. R. soc. London ser. B* 312: 325-42
- AVISE J.C.; 2000. Phylogeography: the history and formation of species. *Havard University Press*, 447p: 34-211.
- AVISE J. C.; 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *J. Biogeography*. 36: 3–15;
- BAKER A.C., Stone W.E., Plummer C.C., MacPhail H.; 1944. A review of studies on the mexican fruit fly and related mexican species. *United States Dept. Agric. Misc. Publ.* 531: 1-155.
- BALLARD J. W. O., WHITLOCK M. C.; 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Mol Ecol.* 13: 729–744.
- BARR N. B., McPheron B. A.; 2006 Molecular phylogenetics of the genus *Ceratitis* (Diptera: Tephritidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 38: 216–230.
- BANDELT H-J., Forster P., Röhl A.; 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* 16:37-48.
- BARR N.B., Cui L., McPheron B.A.; 2005. Molecular systematics of nuclear gene *period* in genus *Anastrepha* (Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98(2): 173-180.
- BASSO A., Manso F.; 1998. Are *Anastrepha fraterculus* chromosomal polymorphism an isolation barrier?. *Cytobios* 93: 103-111.
- BASSO A., Sonvico A., Quesada-Allue L.A., Manso F.; 2003. Karyotypic and molecular identification of laboratory stocks of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wiedman) (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 96(4): 1237-44.
- BAZIN E., Glemin S., Galtier N.; 2006. Population Size Does Not Influence Mitochondrial Genetic Diversity in Animals. *Science*. 312.

- BIOEDIT sequence alignment editor.; 1997-2000. Tom Hall. Department of Microbiology, North Carolina State University.
- BOYKIN L. M., Shatters R. G. Jr, Hall D. G., Burns R. E., Franqui R. A.; 2006. Analysis of host preference and geographical distribution of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) using phylogenetic analyses of mitochondrial *cytochrome oxidase I* DNA sequence data. *Bull. Entomol. Res.* 96: 457–469.
- BRUMFIELD R. T., Beerli P., Nickerson D. A., Edwards S. V.; 2003. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends Ecol Evol.* 18 (5): 249-256.
- BUSH G.L.; 1962. The cytotaxonomy of the larvae of some Mexican fruit flies in the genus *Anastrepha* (Tephritidae: Diptera). *Psyche*. 6: 87-101.
- CÁCERES C., Segura D.F., Vera M.T., Wornoayporn V., Cladera J., Teal P., Sapountzis P., Bourtzis K., Zacharopoulou A., Robinson A.S.; 2009. Incipient speciation revealed in *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae) by studies on mating compatibility, sex pheromones, hybridization and cytology. *Biol. J. Linn. Soc.* 97: 152-165.
- CASTOE T. A., Spencer C. L., Parkinson C. L.; 2007. Phylogeographic structure and historical demography of the western diamondbackrattlesnake (*Crotalus atrox*): A perspective on North American desert biogeography. *Mol Phylogenet Evol.* 42(1): 193-212.
- CLARKE A. R., Armstrong K. F., Carmichael A. E., Milne J. R., Raghu S., Roderick G.K., and Yeates D. K.; 2005. Invasive phytophagous pests arising through a recent tropical evolutionary radiation: the *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies. *Annu. Rev. Entomol.* 50:293–319.
- CLARY D.O., Goddard J.M., Martin S.C., Fauron C.M., Wolstenholme D.R.; 1982. *Drosophila* mitochondrial DNA: a novel gene order. *Nucleic. Acids. Res.* 10 (21): 6619-6637.
- COSCRATO V. E., Braz A. S. K., Perondini A. L. P., Selivon D., Marino C. L.; 2009. *Wolbachia* in *Anastrepha* Fruit Flies (Diptera: Tephritidae). *Curr Microbiol.* 59:295-301.
- COUNTERMAN B.A., Noor M. A. F.; 2006. Multilocus Test for Introgression between the Cactophilic Species *Drosophila mojavensis* and *Drosophila arizonae*. *Am. Nat.* 168:682-696.
- COYNE J.A.; 1992. Genetics and speciation. *Nature*. 355: 511-15.
- DOUGLAS L.J., Haymer D.S.; 2001. Ribosomal ITS1 polymorphisms in *Ceratitis capitata* and *Ceratitis rosa* (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94(5): 726-731.
- DYER K. A., Jaenike J. J.; 2004. Evolutionary stable infection by a male-killing endosymbiont in *Drosophila innubila*: molecular evidence from the host and parasite genomes. *Genetics*. 168: 1443–1455.
- EXCOFFIER L., Lischer H.E. L.; 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 10:564-567.
- FEDER J. L., Xie X., Rull J., Velez S., Forbes A., Leung B., Dambroski H., Filchak K. E., Aluja M.; 2005. Mayr, Dobzhansky, and Bush and the complexities of sympatric speciation in *Rhagoletis*. *PNAS*. 102:6573-6580.
- FELSENSTEIN J.; 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- FORSTER P., Torroni A., Renfrew C., Röhl A.; 2001. Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution. *Mol Biol Evol.* 18:1864-1881.
- FRITZ G.N., Engman S., Rodriguez R., Wilkenson R.C.; 2004. Identification of four vectors of human *Plasmodium* spp. by multiplex PCR: *Anopheles rangeli*, *An. strodei*, *An. triannulatus*, and *An. trinkae* (Diptera: Culicidae: Nyssorhynchus). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 41(6): 1111-1115.

- FU Y.X.; 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 147:915-925.
- GENTILE G., Torre A.D.T., Maegga B., Jeffrey R.P., Caccone A.; 2002. Genetic differentiation in the African malaria vector, *Anopheles gambiae* s.s., and the problem of taxonomic status. *Genetics*. 161: 1561-1578.
- GERBER A. S., Loggins R., Kumar S, Dowling T. E.; 2001. Does nonneutral evolution shape observed patterns of DNA variation in animal mitochondrial genomes?. *Annu. Rev. Genet.* 35:539–66.
- GODAY C., Selivon D., Perondini A.L.P., Greciano P.G., Ruiz M.F.; 2006. Cytological characterization of sex chromosomes and ribosomal DNA location in *Anastrepha* species (Diptera, Tephritidae). *Cytol. Gen. Res.* 114: 70-76.
- HABIBABAEI M., Smith M. A., Janzen D. H., Rodriguez J. J., Whitfield J. B., Hebert P. D. N.; 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Mol. Ecol.* 6: 959–964.
- HAMILTON M. B.; 2009. Molecular evolution. Em: *Population genetics*. Wiley-Blackwell Publishing, West Sussex. 235-282.
- HAN H., Ro K.; 2005. Molecular phylogeny of the superfamily Tephritoidea (Insecta: Diptera): new evidence from the mitochondrial. *Mol. Phylogenet. Evol.* 34: 416–430.
- HARPENDING H. C., Sherry S. T., Rogers A. R.; 1993. Genetic structure of ancient human populations. *Curr. Anthropol.* 34:483-496.
- HARPENDING H. C.; 1994. Signature of Ancient Population Growth in Low-Resolution Mitochondrial DNA Mismatch Distribution. *Am J Hum Biol.* 6(4):591-600.
- HARVEY M. L., Mansell M. W., Villet M. H., Dadour I. R.; 2003. Molecular identification of some forensically important blowflies of southern Africa and Australia. *Med. Vet. Entomol.* 17: 363-369
- HEBERT P.D.N., Penton E.H., Burns J.M., Janzen D.H., Hallwachs W.; 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl Acad. Sci.* 101: 14812–14817.
- HEBERT P.D.N., Stoeckle M.Y., Zemplak T.S., Francis C.M.; 2004b. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol.* 2: 1657–1663.
- HERNÁNDEZ-ORTIZ V., Bartolucci A. F., Morales-Valles P., Frías D., Selivon D.; 2012. Cryptic Species of the *Anastrepha fraterculus* Complex (Diptera: Tephritidae): A Multivariate Approach for the Recognition of South American Haplotypes. *Ann Entomol Soc Am.* 105(2): 305-318.
- HURST G. D. D., Jiggins F. M.; 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proc. R. Soc. B.* 272: 1525-1534.
- JAMNONGLUK W., Baimai V., Kittayapong P.; 2003. Molecular evolution of tephritid fruit flies in the genus *Bactrocera* based on the *cytochrome oxidase I* gene. *Genetica*. 119(1):19-25.
- JOWETT T., Rizki T.M., Rizki R.M.; 1986. Regulation of synthesis of larval serum proteins after transplantation of larval fat body into adult *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* 116(1): 23-30.
- LACHAISE D., Harry M., Solignac M., Lemeunier F., Benassi V., Cariou M-L.; 2000. Evolutionary novelties in islands: *Drosophila santomea*, a new *melanogaster* sister species from São Tomé. *Proc. R. Soc. B.* 267:1487–1495.
- LI W. H.; 1993. Unbiased estimation of the Rates of synonymous and nonsynonymous substitution. *J Mol Evol.* 36:96-99.
- LIBRADO P., Rozas J.; 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- LYNCH M.; 2007. Why Population Size Matter. Em: *The origins of genome architecture*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 69-100.
- MALAVASI A., Souza H. M.L., De Conti E., Cytrynowicz M.; 1981. Allozymic variability in an introduced fruit fly pest *Ceratitis capitata* (Wiedemann), 1824, (Diptera: Tephritidae). *Rev. Basil. Genet.*, 2: 183-91.

- MALAVASI A., Morgante J. S.; 1982. Genetic variation in natural populations of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). *Rev. Bras. Gent.* 5:263-78.
- MALAVASI A., Morgante J. S.; 1983. Population genetics of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) in different hosts: Genetic differentiation and heterozygosity. *Genetica*. 60:2017-11.
- MALAVASI A., Zucchi R.A., Sugayama R.L.; 2000. "Moscas-das-frutas de interesse econômico no Brasil: conhecimento básico e aplicado". Em: *Biogeografia*, Malavasi A., Zucchi R.A. (eds.), Holos, Ribeirão Preto. 93-98.
- MASCARENHAS R. O.; 2007. Endossimbionte *Wolbachia* em moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* (Tephritidae) e em vespas parasitóides (Braconidae) associadas. Dissertação Mestrado, Ciencias Biológicas, USP, São Paulo.
- MCPHERON B.A.; 1990. Recent Advances and Future Directions in Tephritid Population Genetics. Em: *Fruit flies: biology and management*, Aluja M., Liedo P. (eds.), Springer-Verlag, Antigua, Guatemala. 59-64.
- MCPHERON B.A.; 1998. Population Genetics and Cryptic Species. Em: *Area-wide control of fruit flies and other insect pests*, Tan K. (eds.), Penerbit USM, Penang, Malaysia. 483-490.
- MCPHERON B.A., Han H., Silva J.G., Norrbom A.L.; 1999. Phylogeny of genus *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based upon 16S rDNA mitochondrial sequences. Em: *Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior*, Aluja M., Norrbom A.L. (eds.), CRC Press, Boca Ratón, Florida. 343-361.
- MENDES L.O.T.; 1958. Observações citológicas em "moscas-das-frutas". *Bragantia*. 17: 29-39.
- MONNEROT M., Solignac M., Wolstenholme D. R.; 1990. Discrepancy in divergence of the mitochondrial and nuclear genomes of *Drosophila teissieri* and *Drosophila yakuba*. *J. Mol. Evol.* 30: 500-508.
- MORGANTE J.S., Malavasi A., Bush G.L.; 1980. Biochemical systematics and evolutionary relationships of neotropical *Anastrepha*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 73: 622-30.
- MORGANTE J.S., Selivon D., Solferini V.N., Matioli S.R.; 1993. Evolutionary patterns in specialist and generalist species of *Anastrepha*. Em: *Fruit Flies: biology and management*, Aluja M., Liedo P. (eds.), Springer, New York. Proceedings of the 3th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance. 133-47.
- MORGANTE J.S., Selivon D., Solferini V.N., Nascimento A.S.; 1996. Genetic and morphological differentiation in the specialist species *Anastrepha pickeli* and *A. montei*. Em: *Fruit flies pests*, McPherson B.A., Steck G.J. (eds.), St. Lucie. 267-272.
- NARDI F., Carapelli R., Dallai R., Frati F.; 2003. The mitochondrial genome of the olive fly *Bactrocera oleae*: two haplotypes from distant geographical locations. *Insect Mol. Biol.* 12: 605-611
- NACHMAN M. W., Brown W. M., Stoneking M.; Aquadro C. F.; 1996. Nonneutral Mitochondrial DNA Variation in Humans and Chimpanzees. *Genetics*. 142: 953-9153.
- NEI M., Kumar S.; 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. *Oxford University Press*, New York.
- NORRBOM. A. L., Kim, K. C.; 1988. A list of the recorded host plants of the species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). *Washington: USDA, APHIS*, 114.
- NORRBOM A.L., Zucchi R.A., Hernández-Ortiz V.; 1999. Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based on morphology. Em: *Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior*, Aluja M., Norrbom A.L. (eds.) CRC Press, Boca Ratón, Florida. 299-342.
- NORRBOM A.L.; 2002. A revision of the *Anastrepha serpentina* species group (Diptera: Tephritidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 104: 390-436.
- NÚÑEZ J. J., Wood N. K., Rabanal F. E., Fontanella F. M., Sites Jr. J. W.; 2011. Amphibian phylogeography in the Antipodes: Refugia and postglacial colonization

- explain mitochondrial haplotype distribution in the Patagonian frog *Eupsophus calcaratus* (Cycloramphidae). *Mol Phylogenet Evol.* 58(2):343-352.
- POLZIN T., Daneschmand S. V.; 2003. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Oper Res Lett.* 31:12-20.
- POSADA D.; 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol.* 25: 1253-1256.
- PREZOTTO L.F.; 2008. Análise do ITS1 do DNA ribossômico em espécies do complexo *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae). Dissertação Mestrado, Ciências Biológicas, USP, São Paulo.
- RAMOS-ONSINS S. E., Rozas J.; 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol Biol Evol.* 19:2092–2100.
- RAND D. M., Dorfsman M., Kann L. M.; 1994. Neutral and non-neutral evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA. *Genetics* 114:741-56.
- RAND D. M.; 2001. The units of selection on Mitochondrial dna. *Annu. Rev Eco. Syst.* 32:415-48
- RIPPLINGER J., SULLIVAN J.; 2008. Does Choice in Model Selection Affect Maximum Likelihood Analysis?. *Syst. Biol.* 57(1):76–85.
- ROGERS A. R., Harpending H.; 1992. Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. *Mol. Bid. Evol.* 9(3):552-569.
- SLATKIN M., HUDSON R. R.; 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics.* 129:555-562.
- SANTOS P.; 1994. Variabilidade No Dna Mitocondrial Em Populações de Três Espécies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). Dissertação Mestrado, Ciências Biológicas, USP, São Paulo.
- SAMBROOK J., Fritsch E. F., Maniatis T.; 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* 2 ed.
- SELIVON D., Morgante J.S., Ribeiro A.F., Perondini A.L.P.; 1996. Extrusion of masses of yolk during embryony development of the fruit fly *Anastrepha fraterculus*. *Inv. Reprod. Dev.* 29: 1-7.
- SELIVON D., Perondini A.L.P.; 1998. Eggshell morphology in two cryptic species of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc.* 91: 473-478.
- SELIVON D., Perondini A.L.P., Morgante J.S.; 1999. Haldane's rule and other aspects of reproductive isolation observed in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). *Genet. Mol. Biol.* 22: 507–510.
- SELIVON D., Perondini A.L.P., Ribeiro A.F., Marino C.L., Lima M.M.A., Coscrato V.E.; 2002. *Wolbachia* endosymbiont in a species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). *Invert. Reprod. Develop.* 42: 121-127.
- SELIVON D., Vretos C., Fontes L., Perondini A.L.P.; 2004. New variant forms in the *Anastrepha fraterculus* complex, *Proc. 6th International Fruit Flies Symposium*, 6-10 May, Stellenbosh, South Africa, B. Barnes (ed.), Isteg Scientific Publications, Irene, Africa do Sul. 253-258.
- SELIVON D., Perondini A.L.P., Morgante J.S.; 2005. A genetic-morphological characterization of two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98(3): 367-381.
- SELIVON D., Perondini A.L.P.; 2007. Especies crípticas del complejo *Anastrepha fraterculus* en Brasil. Em: *Moscas de la Fruta en Latinoamérica (Diptera: Tephritidae): Diversidad, biología y manejo*, Henández-Ortiz V. (Ed.), S y G editores, Distrito federal, México. 101-118.
- SIMON C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P.; 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene-sequences and a compilation of conserved polymerase chain-reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 651–701.
- SMITH-CALDAS M.R.B., McPheron B.A., Silva J.G., Zucchi R.A.; 2001. Phylogenetic relationships among species of the *fraterculus* group *Anastrepha* (Diptera:

- Tephritidae) inferred from DNA sequences of mitochondrial *cytochrome oxidase I*. *Neo. Entomol.* 30: 565-573
- SMITH M. A., Wood D. M., Janzen D. H., Hallwachs W., Hebert P. D. N.; 2007. DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, *Tachinidae*) are not all generalists. *PNAS.* 104(12): 4967–4972.
- SOLFERINI V.N., Morgante J.S.; 1987. Karyotype study of eight species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). *Caryologia.* 40: 229-41.
- SPANOS L., Koutroumbas G., Kotsyfakis M., Louis C.; 2000. The mitochondrial genome of the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Insect Mol. Biol.* 9(2): 139-144.
- STEFANI R.N., Morgante J.S.; 1996. Genetic variability in *Anastrepha pseudoparallela*: a specialist species. Em: *Fruit fly pests, a world assessment of their biology and management*. McPherson B.M., Steck G.J. (eds.), Delray Beach, St. Lucie Press. 277-280.
- STECK G.J.; 1991. Biochemical systematics and population genetic structure of *Anastrepha fraterculus* and related species (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 84: 10-28.
- STECK G.J., Sheppard W.S.; 1993. Mitochondrial DNA variation in *Anastrepha fraterculus*. Em: *Fruit flies biology and management*. Aluja M., Liedo P. (eds.). Springer New York. 9-14.
- STONE A.; 1942. The fruit flies of the genus *Anastrepha*. *United States Dept. Agric. Misc. Publ.* 439: 1-112.
- STUMPF M. P.; 2004. Haplotype diversity and SNP frequency dependence in the description of genetic variation. *Eur J Hum Genet.* 12(6):469-77.
- TAJIMA F.; 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics.* 123:585-595.
- TAMURA K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S.; 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- THOMPSON J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.; 1994. Clustal-W - improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* 22: 4673-4680.
- URAMOTO K.; 2007. Diversidade de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) em pomares comerciais de papaia e em áreas remanescentes da Mata Atlântica e suas plantas hospedeiras nativas, no município de Linhares, Espírito Santo. Tese (Doutorado em Ciências), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba.
- VALENTINE J.W.; 1976. Genetic strategies of adaptation. Em: *Molecular Evolution*. Ayala F. J. (eds.). Sinauer Sunderland, Massachusetts. 78-94.
- VELEZ S., Taylor M. S., Noor M. A. F., Lobo N. F., Feder J. L.; 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci from the apple maggot fly *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae). *Mol. Ecol. Notes* 6: 90-92.
- VERA T. M., Cáceres C., Wornoayporn V., Islam A., Robinson S. A., De La Vega M. H., Hendrichs J., Cayol J.; 2006. Mating incompatibility among populations of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 99 (2): 387-397.
- VIRGILIO M., Backeljau T., Barr N., De Meyer M.; 2008. Molecular Evaluation of nominal species in the *Ceratitis fasciventris*, *C. anonae*, *C. rosa* complex (Diptera: Tephritidae). *Mol. Phylogent Evol.* 48(1): 270-280.
- WHITE I.M., Elson-Harris M.M.; 1992. Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics. Em: *CAB International*. Wallingford, UK.
- WRIGHT S.; 1969. Evolution and the Genetics of Populations. *University of Chicago Press*, Chicago. v.2.

- WRIGHT, S.; 1978. Evolution and genetics of populations. *University of Chicago Press*, 511p.
- YE J., Yi J., Zhou G., Ruan C., Yin L., Wang W.; Sequence analysis on complete mitochondrial genes of *Bactrocera dorsalis*, *B. papayae*, *B. carambolae* and *B. philippinensis* (Diptera:Tephritidae). GenBank (NCBI). *Não publicado*.
- YU D.J., Xu L., Nardi F., Li J.G., Zhang R.J.; 2007. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Gene*. 396(1): 66-74.
- ZUCCHI R.A.; 2000. Espécies de *Anastrepha*, sinonímias, plantas hospedeiras e parasitóides. Em: *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil. Conhecimento básico e aplicado*, Malavasi A., Zucchi R.A. (eds.). FAPESP - Holos Editora, Ribeirão Preto. 13-14.
- ZUCCHI R.A.; 2007. Diversidad, distribución y hospederos del género *Anastrepha* en Brasil. Em: *Moscas de la fruta en Latinoamérica (Diptera: Tephritidae): diversidad, biología y manejo*, Hernández-Ortiz V. (ed.). S y G editores, Distrito Federal. 77-1.

VIII. 1. Referências digitais

- Programa FigTree v1.3.1. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Acesso em: 10/11/2011
- Programa Network 4.6. <http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>. Acesso em: 12/01/2011
- Programa R. <http://www.r-project.org/>. Acesso em: set/2011.
- ZUCCHI, R.A. 2008. Fruit flies in Brazil - *Anastrepha* species their host plants and parasitoids. Disponível em: www.lea.esalq.usp.br/anastrepha/, atualizado em 10 de Agosto, 2011. Acesso em: mar/2011

IX. Anexos

Anexo I – Regiões de origem das amostras de *Anastrepha fraterculus* utilizadas

Anexo II – Alinhamento das sequências do COI das amostras coletadas gerado pelo método ClustaW.

[illegible]

H38	ACACTATTAC	TAGTAAGTAG	TATAGTAGAA	AACGGAGCTG	GTACAGGATG	AACTGTTTAT	CCTCCATTAT	CATCTTTAAT	CGCTCATGGA	GGAGCTTCAG
H39	ACACTATTAC	TAGTAAGTAG	TATAGTAGAA	AACGGAGCTG	GTACAGGATG	AACTGTTTAT	CCTCCATTAT	CATCTTTAAT	CGCTCATGGA	GGAGCTTCAG
H40	ACACTATTAC	TAGTAAGTAG	TATAGTAGAA	AACGGAGCTG	GTACAGGATG	AACTGTTTAT	CCTCCATTAT	CATCTTTAAT	CGCTCATGGA	GGAGCTTCAG
H41	ACACTATTAC	TAGTAAGTAG	TATAGTAGAA	AACGGAGCTG	GTTCACGATG	AACTGTTTAT	CCTCCATTAT	CATCTTTAAT	CGCTCATGGA	GGAGCTTCAG
H42	ACACTATTAC	TAGTAAGTAG	TATAGTAGAA	AACGGAGCTG	GTACAGGATG	AACTGTTTAT	CCTCCATTAT	CATCTTTAAT	CGCTCATGGA	GGAGCTTCAG
H43	ACACTATTAC	TAGTAAGTAG	TATAGTAGAA	AACGGAGCTG	GTACACGATG	AACTGTTTAT	CCTCCATTAT	CATCTTTAAT	CGCTCATGGA	GGAGCTTCAG
H44	ACACTATTAC	TAGTAAGTAG	TATAGTAGAA	AACGGAGCTG	GTACAGGATG	AACTGTTTAT	CCTCCATTAT	CATCTTTAAT	CGCTCATGGA	GGAGCTTCAG
H45	ACACTATTAC	TAGTAAGTAG	TATAGTAGAA	AACGGAGCTG	GTACAGGATA	AACTGTTTAT	CCTCCATTAT	CATCTTTAAT	CGCTCATGGA	GGAGCTTCAG
A_grandis	ACATTACTGC	TAGTAAGCAG	AATAGTAGAA	AACGGAGCTG	GTACAGGATG	AACTGTTTAC	CCTCCATTAT	CCTCTTTAAT	TGCTCATGGA	GGAGCTTCAG
A_striata	ACATTACTAC	TAGTAAGTAG	TATAGTAGAA	ACCGGGGCTG	GTACAGGTTG	AACTGTTTAC	CCTCCATTAT	CATCTTTAAT	TGCTCATGGG	GGAGCTTCAG
A_obliqua_	TTTATATTCT	AATTTTACCT	GGATTTCGAA	TAATTTCTCA	TATTATTAGT	CAAGAATCAG	GTA AAAAAGGA	AACATTG TGT	TCTTTAGGAA	TAATTTATGC
A_obliqua_	TTTATATTCT	AATTTTACCT	GGATTTCGAA	TAATTTCTCA	TATTATTAGT	CAAGAATCAG	GTA AAAAAGGA	AACATTG TGT	TCTTTAGGAA	TAATTTATGC
A_obliqua_	TTTATATTCT	AATTTTACCT	GGATTTCGAA	TAATTTCTCA	TATTATTAGT	CAAGAATCAG	GTA AAAAAGGA	AACATTG TGT	TCTTTAGGAA	TAATTTATGC
A_zenildae	TTTATATCCT	AATTTTACCT	GGATTTCGAA	TAATTTCTCA	TATTATTAGT	CAAGAGTCAG	GTA AAAAAGGA	GACATTG TGT	TCTTTAGGAA	TAATTTATGC
A_grandis_	TCTATATTCT	AATTTTACCT	GGATTTCGAA	TAATTTCTCA	TATTATTAGT	CAAGAATCAG	GTA AAAAAGGA	AACATTG TGT	TCTTTAGGAA	TAATTTATGC
A_bistriga	TTTATATTCT	AATTTTACCT	GGATTTCGAA	TAATTTCTCA	TATTATTAGT	CAAGAATCAG	GTA AAAAAGGA	AACATTG TGT	TCTTTAGGAA	TAATTTATGC
C_capitata	TTTACATTTT	AATTTTACCA	GGATTTCGAA	TAATTTCTCA	TATTATTAGA	CAAGAATCAG	GTA AAAAAGGA	AACATTG TGT	TCATTAGGAA	TAATTTATGC

										
	105	115	125	135	145	155	165	175	185	195
H1	TAGATTTAGC	CATTTTTTGA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAAGAGTAA	ATTGTATCAC	CCCAGTAATT	AATATGCGAT	CTACGGGTAT
H2	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H3	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H4	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H5	TAGATTTAGC	CATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATCAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACGGGTAT
H6	TAGATTTAGC	CATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATCAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H7	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H8	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H9	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H10	TAGATTTAGC	CATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATCAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H11	TAGATTTAGC	CATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATCAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H12	TAGATTTAGC	CATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATCAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H13	TAGATTTAGC	CATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATCAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H14	TAGATTTAGC	CATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATCAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H15	TAGATTTAGC	CATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATCAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H16	TAGATTTAGC	CATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATCAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H17	TAGATTTAGC	CATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATCAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACGGGTAT
H18	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H19	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H20	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACGGGTAT
H21	TAGATTTAGC	CATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATCAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT

H22	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H23	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACGGGTAT
H24	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H25	TAGATTTAGC	CATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATCAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACGGGTAT
H26	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H27	TAGATTTAGC	CATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATCAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H28	TAGATTTAGC	CATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATCAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H29	TAGATTTAGC	CATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATCAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H30	TAGATTTAGC	CATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATCAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H31	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H32	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H33	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H34	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H35	TAGATTTAGC	CATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATCAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H36	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H37	TAGATTTAGC	TATTTTTTGA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTGTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACGGGTAT
H38	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTGTATTAC	AACAGTAATT	AATATACAAT	CTACGGGTAT
H39	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTGCATTAC	AACAGTAATT	AATATACAAT	CTACTGGTAT
H40	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACGGGTAT
H41	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H42	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACGGGTAT
H43	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H44	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTTTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
H45	TAGATTTAGC	TATTTTTTCA	TTACATTTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGAGCAGTAA	ATTGTATTAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACGGGTAT
A_grandis	TAGATTTAGC	TATCTTTTCA	TTACACCTAG	CTGGAATTTT	ATCAATCTTA	GGAGCAGTAA	ATTTCATCAC	AACAGTAATT	AACATACGAT	CTGCGGTAT
A_striata	TAGACTTAGC	TATTTTTTCA	TTACACCTAG	CTGGAATTTT	ATCAATTCTA	GGGGCAGTAA	ATTTTATCAC	AACAGTAATT	AATATACGAT	CTACTGGTAT
A_obliqua_	AATAATAGCA	ATTGGACTAT	TAGGATATAT	TGTATGAGCC	CATCACATAT	TTACTGTTGG	AATAGACGTA	GATACACGGG	CATATTTTAC	ATCAGCTACT
A_obliqua_	AATAATAGCA	ATTGGACTAT	TAGGATTAT	TGTATGAGCC	CATCACATAT	TTACTGTTGG	AATAGACGTA	GATACACGGG	CATATTTTAC	ATCAGCTACT
A_obliqua_	AATAATAGCA	ATTGGACTAT	TAGGATTAT	TGTATGAGCC	CATCACATAT	TTACTGTTGG	AATAGACGTA	GATACACGGG	CATATTTTAC	ATCAGCTACT
A_zenildae	AAAAATAGCA	ATTGGACTAT	TAGGATTAT	TGTATGGGCC	CATCACATGT	TTACTGTGGG	AATAGACGGA	GACCCCGAG	CATATTTTAC	ATCAGCTACT
A_grandis_	AATAATAGCA	ATTGGCTTAT	TAGGATTAT	TGTATGAGCA	CATCATATAT	TTACTGTTGG	AATAGATGTA	GATACACGAG	CATATTTTAC	ATCAGCTACT
A_bistriga	AATAATAGCA	ATTGGATTAT	TAGGGTTTAT	TGTATGAGCT	CATCACATAT	TTACTGTTGG	AATAGACGTA	GACACACGAG	CATATTTTAC	ATCAGCTACT
C_capitata	TATACTAGCT	ATTGGATTAT	TAGGATTAT	TGTTTGAGCA	CCCCATATAT	TTACAGTTGG	TATAGACGTT	GACACACGAG	CTTACTTTAC	ATCAGCAACT

										
	205	215	225	235	245	255	265	275	285	295
H1	AACATTTGAT	CGAATACCTT	TATTTGTGTG	AGCTGTAGCA	TTAACAGCTC	TATTATTACC	TTTATCTTTA	CCGGTACTAG	CTGGTGCAAT	TACTATATTA
H2	AACATTTGAT	CGAATACCTT	TATTTGTATG	AGCTGTAGTA	TTAACAGCAC	TATTATTACT	TTTATCTTTA	CCAGTACTAG	CTGGTGCAAT	TACTATATTA
H3	AACATTTGAT	CGAATACCTT	TATTTGTATG	AGCTGTAGTA	TTAACAGCAC	TATTATTACT	TTTATCTTTA	CCAGTACTAG	CTGGTGCAAT	TACTATATTA
H4	AACATTTGAT	CGAATACCTT	TATTTGTATG	AGCTGTAGTA	TTAACAGCAC	TATTATTACT	TTTATCTTTA	CCAGTACTAG	CTGGTGCAAT	TACTATATTA
H5	AACATTTGAT	CGAATACCTT	TATTTGTATG	AGCTGTAGTA	TTAACAGCAC	TATTATTACT	TTTATCTTTA	CCAGTACTAG	CTGGTGCAAT	TACTATATTA

A_striata	AACATTTGAC	CGAATACCAT	TATTTGTATG	AGCTGTAGTA	TTAACAGCAC	TATTATTACT	TCTATCCTTA	CCAGTACTAG	CAGGTGCAAT	TACAATATTG
A_obliqua_	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACWTGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
A_obliqua_	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
A_zenildae	ATAATTATGG	CAGTACCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTTCATGGA	ACCCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATATTA	TGAGCTCTAG
A_grandis_	ATAATTATTG	CAGTTCCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTTCACGGA	ACTCAACTAA	ACTATTCACC	AGCAATACTA	TGAGCATTAG
A_bistriga	ATAATTATTG	CAGTACCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAACTAA	ATTATTCCCC	AGCAATATTA	TGAGCTCTAG
C_capitata	ATAATTATTG	CGGTACCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTTCAGTT	GACTTGCTAC	ACTTCATGGK	ACACAATTAA	ATTATTCCCC	AGCTATACTA	TGAGCTCTTG
										
	305	315	325	335	345	355	365	375	385	395
H1	TGAGCTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGACCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAGTC	TTGTACCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CGCCAGAAG
H2	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H3	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H4	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H5	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATACCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H6	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATACCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H7	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H8	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H9	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H10	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATACCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H11	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATACCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H12	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATACCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H13	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATACCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H14	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	GCGGCGGAGG	AGATCCAATT	TTATACCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H15	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGACCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATACCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H16	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATACCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H17	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATACCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H18	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H19	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H20	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H21	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATACCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H22	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H23	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CCCCAGAAG
H24	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATACCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H25	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATACCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H26	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H27	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATACCAAC	CTTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H28	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATACCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H29	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATACCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H30	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATACCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG

H31	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H32	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCGG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TGATATCAAC	ATTTATTTTG	GATTTTTGGT	CACCCAGAAG
H33	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H34	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H35	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATACCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H36	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TGATATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H37	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTGGATCCGG	CTGGCGGAGG	AGATCCAATT	TTGTATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H38	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTGGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H39	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGCGGAGG	AGATCCAATT	TTGTATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H40	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H41	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H42	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H43	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H44	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
H45	TTAACTGACC	GAAACTTAAA	TACATCTTTT	TTTGATCCTG	CTGGCGGAGG	AGATCCAATT	TTGTATCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
A_grandis	CTAACAGATC	GAAATTTAAA	CACATCATTT	TTTGACCCTG	CTGGAGGAGG	AGATCCTATT	TTATACCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTTGGT	CACCCAGAAG
A_striata	TTAACAGATC	GAAATTTAAA	CACCTCGTTT	TTTGACCCTG	CTGGAGGAGG	AGACCCAATT	TTATACCAAC	ATTTATTTTG	ATTTTTCGGT	CACCCAGAAG
A_obliqua_	GGTTTGTTTT	TTTATTTACA	GTAGGAGGAT	TAACCTGGAGT	AATACTTGCT	AATTCATCTG	TAGATATTAT	TTTACATGAT	ACTTATTATG	TAGTAGCACA
A_obliqua_	GGTTTGTTTT	TTTATTTACA	GTAGGAGGAT	TAACCTGGAGT	AATACTTGCT	AATTCATCTG	TAGATATTAT	TTTACATGAT	ACTTATTATG	TAGTAGCACA
A_zenildae	GATTTGTTTT	TTTATTTACA	GTAGGAGGAT	TAACCTGGAGT	AATACTTGCT	AATTCATCTG	TAGATATTAT	TTTGCATGAT	ACTTATTATG	TAGTAGCACA
A_grandis_	GATTTGTTTT	CTTATTCACA	GTTGGAGGAC	TAACCTGGTGT	AATACTTGCT	AATTCATCCG	TCGATATCAT	CCTACATGAC	ACTTACTATG	TAGTAGCCCA
A_bistriga	GATTTGTTTT	CTTATTTACA	GTAGGAGGAT	TAACAGGAGT	AATACTTGCT	AATTCATCTG	TTGATATTAT	TTTACATGAT	ACTTATTATG	TCGTAGCACA
C_capitata	GATTTGTATT	TTTATTTACA	GTTGGAGGTT	TAACGGGAGT	TGTTCTTGCT	AATTCCTTCTG	TTGATATTAT	TCTTCACGAT	ACTTATTATG	TTGTTGCTCA

										
	405	415	425	435	445	455	465	475	485	495
H1	CCTATATTCC	AATTTTCCGT	GGATTTGGAA	CAATTTCTCA	TATTATTAGT	CAAGAAGCAG	GAAAAAAGGA	AACATTTGGT	TCTTTAGGAA	TAATTTATGC
H2	TTTATATTCT	AATTTTACCT	GGATTTGGAA	TAATTTCTCA	TATTATTAGT	CAAGAATCAG	GAAAAAAGGA	AACATTTGGT	TCTTTAGGAA	TAATTTATGC
H3	TTTATATTCT	AATTTTACCT	GGATTTGGAA	TAATTTCTCA	TATTATTAGT	CAAGAATCAG	GAAAAAAGGA	AACATTTGGT	TCTTTAGGAA	TAATTTATGC
H4	TTTATATTCT	AATTTTACCT	GGATTTGGAA	TAATTTCTCA	TATTATTAGT	CAAGAATCAG	GAAAAAAGGA	AACATTTGGT	TCTTTAGGAA	TAATTTATGC
H5	TTTATATTCT	AATTTTACCT	GGATTTGGAA	TAATTTCTCA	TATTATTAGT	CAAGAATCAG	GAAAAAAGGA	AACATTTGGT	TCTTTAGGAA	TAATTTATGC
H6	TTTATATTCT	AATTTTACCT	GGATTCGGAA	TAATTTCTCA	TATTATTAGT	CAAGAATCAG	GAAAAAAGGA	AACATTTGGT	TCTTTAGGAA	TAATTTATGC
H7	TTTATATTCT	AATTTTACCT	GGATTTGGAA	TAATTTCTCA	TATTATTAGT	CAAGAATCAG	GAAAAAAGGA	AACATTTGGT	TCTTTAGGAA	TAATTTATGC
H8	TTTATATTCT	AATTTTACCT	GGATTTGGAA	TAATTTCTCA	TATTATTAGT	CAAGAATCAG	GAAAAAAGGA	AACATTTGGT	TCTTTAGGAA	TAATTTATGC
H9	TTTATATTCT	AATTTTACCT	GGATTTGGAA	TAATTTCTCA	TATTATTAGT	CAAGAATCAG	GAAAAAAGGA	AACATTTGGT	TCTTTAGGAA	TAATTTATGC
H10	TTTATATTCT	AATTTTACCT	GGATTTGGAA	TAATTTCTCA	TATTATTAGT	CAAGAATCAG	GAAAAAAGGA	AACATTTGGT	TCTTTAGGAA	TAATTTATGC
H11	TTTATATTCT	AATTTTACCT	GGATTTGGAA	TAATTTCTCA	TATTATTAGT	CAAGAATCAG	GAAAAAAGGA	AACATTTGGT	TCTTTAGGAA	TAATTTATGC
H12	TTTATATTCT	AATTTTACCT	GGATTTGGAA	TAATTTCTCA	TATTATTAGT	CAAGAATCAG	GAAAAAAGGA	AACATTTGGT	TCTTTAGGAA	TAATTTATGC
H13	TTTATATTCT	AATTTTACCT	GGGTTTGGAA	TAATTTCTCA	TATTATTAGT	CAAGAATCAG	GAAAAAAGGA	AACATTTGGT	TCTTTAGGAA	TAATTTATGC
H14	TAGATATTCT	AATTTAACCT	GGATTTGGAA	TAATTTCTCA	TATTATTAGT	CAAGAAGGTG	AGAAAAAGGA	AACATTTGGT	TCTTTAGGAA	TAATTTATGC

[illegible]

H40	AATAATAGCA	ATTGGACTAT	TAGGATTTAT	TGTATGAGCC	CATCACATAT	TTACTGTTGG	AATAGACGTA	GATACACGGG	CATATTTTAC	ATCAGCTACT
H41	AATAATAGCA	ATTGGACTAT	TAGGATTTAT	TGTATGAGCC	CATCACATAT	TTACTGTTGG	AATAGACGTA	GATACACGGG	CATATTTTAC	ATCAGCTACT
H42	AATAATAGCA	ATTGGACTAT	TAGGATTTAT	TGTATGAGCC	CATCACATAT	TTACTGTTGG	AATAGACGTA	GATACACGGG	CATATTTTAC	ATCAGCTACT
H43	AATAATAGCA	ATTGGACTAT	TAGGATTTAT	TGTATGAGCC	CATCACATAT	TTACTGTTGG	AATAGACGTA	GATACACGGG	CATATTTTAC	ATCAGCTACT
H44	AATAATAGCA	ATTGGACTAT	TAGGATTTAT	TGTATGAGCC	CATCACATAT	TTACTGTTGG	AATAGACGTA	GATACACGGG	CATATTTTAC	ATCAGCTACT
H45	AATAATAGCA	ATTGGACTAT	TAGGATTTAT	TGTATGAGCC	CATCACATAT	TTACTGTTGG	AATAGACGTA	GATACACGGG	CATATTTTAC	ATCAGCTACT
A_grandis	AATAATAGCA	ATTGGCTTAT	TAGGATTTAT	TGTATGAGCA	CATCATATAT	TTACTGTTGG	AATAGATGTA	GATACACGAG	CATATTTTAC	ATCAGCTACT
A_striata	AATAATAGCA	ATTGGATTAT	TAGGATTTAT	TGTATGAGCT	CATCACATAT	TTACTGTTGG	AATAGACGTA	GACACACGAG	CATATTTTAC	ATCAGCTACT
A_obliqua_	TTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTTATC	GGAGTAAATT	TGACATTCTT	TCCCAACAT	TTTTTAGGAC	TAGCAGGTAT	ACCTCGACGA	TATTCAGATT
A_obliqua_	TTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTTATC	GGAGTAAATT	TGACATTCTT	TCCCAACAT	TTTTTAGGAC	TAGCAGGTAT	ACCTCGACGA	TATTCAGATT
A_obliqua_	TTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTTATC	GGAGTAAATT	TGACATTCTT	TCCCAACAT	TTTTTAGGAC	TAGCAGGTAT	ACCTCGACGA	TATTCAGATT
A_zenildae	CTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTTATC	GGAGTAAATT	TAACATTTT	TCCCAACAT	TTCTTAGGAC	TAGCAGGTAT	ACCACGACGA	TATTCAGATT
A_grandis_	TTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTTATT	GGAGTAAATT	TAACATTCTT	CCCACAACAC	TTCTTAGGAT	TAGCAGGAAT	ACCCGCGCGA	TACTCAGATT
A_bistriga	TTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTCATT	GGAGTAAATT	TAACATTCTT	CCCTCAACAC	TTCTTAGGAT	TAGCAGGTAT	ACCGCGACGA	TACTCAGATT
C_capitata	TTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTTATC	GGAGTAAATT	TAACATTCTT	TCCTCAACAT	TTTTTAGGAT	TAGCCGGAAT	ACCTCGGCGA	TATTCAGACT
										
	605	615	625	635	645	655	665	675	685	695
H1	ATAATTATTG	CAGTACCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATATTA	TGAGCTCTAG
H2	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H3	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H4	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H5	ATAATTATTG	CAGTACCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATATTA	TGAGCTCTAG
H6	ATAATTATTG	CAGTACCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATATTA	TGAGCTCTAG
H7	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H8	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H9	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H10	ATAATTATTG	CAGTACCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATATTA	TGAGCTCTAG
H11	ATAATTATTG	CAGTACCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATATTA	TGAGCTCTAG
H12	ATAATTATTG	CAGTACCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATATTA	TGAGCTCTAG
H13	ATAATTATTG	CAGTACCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATATTA	TGAGCTCTAG
H14	ATAATTATTG	CAGTACCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATATTA	TGAGCTCTAG
H15	ATAATTATTG	CAGTACCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATATTA	TGAGCTCTAG
H16	ATAATTATTG	CAGTACCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATATTA	TGAGCTCTAG
H17	ATAATTATTG	CAGTACCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATATTA	TGAGCTCTAG
H18	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H19	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H20	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H21	ATAATTATTG	CAGTACCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATATTA	TGAGCTCTAG
H22	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	CCTACATGGA	ACTCAATTAA	TTTACTCCCC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H23	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG

H24	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H25	ATAATTATTG	CAGTACCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATATTA	TGAGCTCTAG
H26	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H27	ATAATTATTG	CAGTACCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATATTA	TGAGCTCTAG
H28	ATAATTATTG	CAGTACCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATATTA	TGAGCTCTAG
H29	ATAATTATTG	CAGTACCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATATTA	TGAGCTCTAG
H30	ATAATTATTG	CAGTACCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATATTA	TGAGCTCTAG
H31	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H32	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H33	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H34	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H35	ATAATTATTG	CAGTACCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATATTA	TGAGCTCTAG
H36	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H37	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H38	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H39	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H40	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H41	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H42	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H43	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H44	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
H45	ATAATTATTG	CTGTACCAAC	AGGAATCAAA	ATTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTACATGGA	ACTCAATTAA	ATTACTCACC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
A_grandis	ATAATTATTG	CAGTTCCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTTTCACGGA	ACTCAACTAA	ACTATTCCACC	AGCAATACTA	TGAGCATTTAG
A_striata	ATAATTATTG	CAGTACCAAC	AGGAATTAAA	ATTTTTCAGTT	GATTAGCTAC	ACTGCATGGA	ACTCAACTAA	ATTATTCCCC	AGCAATACTA	TGAGCTCTAG
A_obliqua_	ATCCAGATGC	ATATACAACA	TGAAATATTA	TTTCAACTAT	TGGATCTTCT	ATTTTCATTAT	TAGGAATTTT	ATTTTTCCTTA	TTTATTATTT	GAGAAAGTAT
A_obliqua_	ATCCAGATGC	ATATACAACA	TGAAATATTA	TTTCAACTAT	TGGATCTTCT	ATTTTCATTAT	TAGGAATTTT	ATTTTTCCTTA	TTTATTATTT	GAGAAAGTAT
A_obliqua_	ATCCAGATGC	ATATACAACA	TGAAATATTA	TTTCAACTAT	TGGATCTTCT	ATTTTCATTAT	TAGGAATTTT	ATTTTTCCTTA	TTTATTATTT	GAGAAAGTAT
A_zenildae	ACCCAGACGC	ATATACAACA	TGAAATATTA	TCTCAACTAT	TGGATCTTCT	ATTTTCATTAT	TAGGAATTTT	ATTTTTCCTTA	TTTATTATTT	GAGAAAGCAA
A_grandis_	ACCCAGATGC	ATACACAACA	TGAAATATCA	CCTCAACTAT	TGGATCTTCC	ATTTTCATTAT	TAGGAATTTT	ATTTTTCCTTA	TTTATTATTT	GAGAAAGTAT
A_bistriga	ACCCAGATGC	ATACACAACA	TGAAATATTA	TCTCAACTAT	TGGGTCTTCT	ATTTTCATTAT	TAGGAATTTT	ATTTCTTCTTA	TTTATTATTT	GAGAAAGTAT
C_capitata	ATCCAGATGC	TTACACAAC	TGAAACGTAA	TTTCAACAAT	TGGCTCTTCA	ATTTCTTTAC	TAGGAATTTT	ATTTTTCCTTA	TTTATTATTT	GAGAAAGCCT

....										
705	715	725	735	745	755	765	775	785	795	

H1	GATTTGTTTT	TTTATTTACA	GTAGGAGGAT	TAACCTGGAGT	AATACTTGCT	AATTCATCTG	TAGATATTAT	TTTACATGAC	ACTTATTATG	TAGTAGCACA
H2	GGTTTGTTTT	TTTATTTACA	GTAGGAGGAT	TAACCTGGAGT	AATACTTGCT	AATTCATCTG	TAGATATTAT	TTTACATGAT	ACTTATTATG	TAGTAGCACA
H3	GGTTTGTTTT	TTTATTTACA	GTAGGAGGAT	TAACCTGGAGT	AATACTTGCT	AATTCATCTG	TAGATATTAT	TTTACATGAT	ACTTATTATG	TAGTAGCACA
H4	GGTTTGTTTT	TTTATTTACA	GTAGGAGGAT	TAACCTGGAGT	AATACTTGCT	AATTCATCTG	TAGATATTAT	TTTACATGAT	ACTTATTATG	TAGTAGCACA
H5	GATTTGTTTT	TTTATTTACA	GTAGGAGGAT	TAACCTGGAGT	AATACTTGCT	AATTCATCTG	TAGATATTAT	TTTACATGAT	ACTTATTATG	TAGTAGCACA
H6	GATTTGTTTT	TTTATTTACA	GTAGGAGGAT	TAACCTGGAGT	AATACTTGCT	AATTCATCTG	TAGATATTAT	TTTACATGAT	ACTTATTATG	TAGTAGCACA
H7	GGTTTGTTTT	TTTATTTACA	GTAGGAGGAT	TAACCTGGAGT	AATACTTGCT	AATTCATCTG	TAGATATTAT	TTTACATGAT	ACTTATTATG	TAGTAGCACA

A_obliqua_	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG.			
A_obliqua_	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG.			
A_zenildae	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTATCCTAT	ACAACTAAG.			
A_grandis	AATTTCTCAA	CGACAAGTTA	TCTACCCTAT	ACAACTAAG.			
A_bistriga	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAGCTAAG.			
C_capitata	TGTTTCTCAA	CGTCAAGTAA	TTTATCCAAT	ACATTTAAA.			

[illegible]

[illegible]

												
	905	915	925	935	945	955	965	975	985	995		
H1	TTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTTATC	GGAGTAAATT	TGACATTCTT	TCCTCAACAT	TTTTTAGGAC	TAGCAGGTAT	ACCTCGACGA	TATTCAGATT		
H2	TTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTTATC	GGAGTAAATT	TGACATTCTT	TCCCCAACAT	TTTTTAGGAC	TAGCAGGTAT	ACCTCGACGA	TATTCAGATT		
H3	TTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTTATC	GGAGTAAATT	TGACATTCTT	TCCCCAACAT	TTTTTAGGAC	TAGCAGGTAT	ACCTCGACGA	TATTCAGATT		
H4	TTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTTATC	GGAGTAAATT	TGACATTCTT	TCCCCAACAT	TTTTTAGGAC	TAGCAGGTAT	ACCTCGACGA	TATTCAGATT		
H5	TTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTTATC	GGAGTAAATT	TAACATTCTT	TCCTCAACAT	TTTTTAGGAC	TAGCAGGTAT	ACCTCGACGA	TATTCAGATT		
H6	TTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTTATC	GGAGTAAATT	TGACATTCTT	TCCTCAACAT	TTTTTAGGAC	TAGCAGGTAT	ACCTCGACGA	TATTCAGATT		
H7	TTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTTATC	GGAGTAAATT	TGACATTCTT	TCCCCAACAT	TTTTTAGGAC	TAGCAGGTAT	ACCTCGACGA	TATTCAGATT		
H8	TTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTTATC	GGAGTAAATT	TGACATTCTT	TCCCCAACAT	TTTTTAGGAC	TAGCAGGTAT	ACCTCGACGA	TATTCAGATT		
H9	TTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTTATC	GGAGTAAATT	TGACATTCTT	TCCCCAACAT	TTTTTAGGAC	TAGCAGGTAT	ACCTCGACGA	TATTCAGATT		
H10	TTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTTATC	GGAGTAAATT	TGACATTCTT	TCCTCAACAT	TTTTTAGGAC	TAGCAGGTAT	ACCTCGACGA	TATTCAGATT		
H11	TTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTTATC	GGAGTAAATT	TGACATTCTT	TCCTCAACAT	TTTTTAGGAC	TAGCAGGTAT	ACCTCGACGA	TATTCAGATT		
H12	TTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTTATC	GGAGTAAATT	TAACATTCTT	TCCTCAACAT	TTTTTAGGAC	TAGCAGGTAT	ACCTCGACGA	TATTCAGATT		
H13	TTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTTATC	GGAGTAAATT	TGACATTCTT	TCCTCAACAT	TTTTTAGGAC	TAGCAGGTAT	ACCTCGACGA	TATTCAGATT		
H14	TTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTTATC	GGAGTAAATT	TGACATTCTT	TCCTCAACAT	TTTTTAGGAC	TAGCAGGTAT	ACCTCGACGA	TATTCAGATT		
H15	TTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTTATC	GGAGTAAATT	TGACATTCTT	TCCTCAACAT	TTTTTAGGAC	TAGCAGGTAT	ACCTCGACGA	TATTCAGATT		
H16	TTAAAAAGTC	AATTTATTAT	TATATTTATC	GGAGTAAATT	TGACATTCTT	TCCTCAACAT	TTTTTAGGAC	TAGCAGGTAT	ACCTCGACGA	TATTCAGATT		

[illegible]

H42	ATCCAGATGC	ATATACAACA	TGAAATATTA	TTTCAACTAT	TGGATCTTCT	ATTTTCATTAT	TAGGAATTTT	ATTTTTCCTTA	TTTATTATTT	GAGAAAGTAT
H43	ATCCAGATGC	ATATACAACA	TGAAATATTA	TTTCAACTAT	TGGATCTTCT	ATTTTCATTAT	TAGGAATTTT	ATTTTTCCTTA	TTTATTATTT	GAGAAAGTTT
H44	ATCCAGATGC	ATATACAACA	TGAAATATTA	TTTCAACTAT	TGGATCTTCT	ATTTTCATTAT	TAGGAATTTT	ATTTTTCCTTA	TTTATTATTT	GAGAAAGTAT
H45	ATCCAGATGC	ATATACAACA	TGAAATATTA	TTTCAACTAT	TGGATCTTCT	ATTTTCATTAT	TAGGAATTTT	ATTTTTCCTTA	TTTATTATTT	GAGAAAGTAT
A_grandis	ACCCAGATGC	ATACACAACA	TGAAATATCA	CCTCAACTAT	TGGATCTTCC	ATTTTCATTAT	TAGGAATTTT	ATTTTTCCTTA	TTTATTATTT	GAGAAAGTAT
A_striata	ACCCAGATGC	ATACACAACA	TGAAATATTA	TCTCAACTAT	TGGATCTTCT	ATTTTCATTAT	TAGGAATTTT	ATTCTTCTTA	TTTATTATTT	GAGAAAGTAT
A_obliqua_										
A_obliqua_										
A_obliqua_										
A_zenildae										
A_grandis_										
A_bistriga										
C_capitata										

....			
1105	1115	1125	1135

H1	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H2	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H3	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H4	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H5	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H6	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H7	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H8	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H9	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H10	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAG	ACAACTAAG
H11	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H12	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H13	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H14	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H15	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H16	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H17	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H18	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H19	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H20	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H21	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H22	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H23	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H24	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H25	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG

H26	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H27	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H28	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H29	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H30	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H31	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H32	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H33	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H34	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H35	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H36	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H37	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H38	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H39	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H40	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H41	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H42	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H43	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H44	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
H45	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAACTAAG
A_grandis	AATTTCTCAA	CGACAAGTTA	TCTACCCTAT	ACAACTAAG
A_striata	AATTTCCCAA	CGACAAGTTA	TTTACCCTAT	ACAGCTAAG
A_obliqua_				
A_obliqua_				
A_obliqua_				
A_zenildae				
A_grandis_				
A_bistriga				
C_capitata				