

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

**Análises morfométricas e moleculares de espécies de *Doryctobracon* Enderlein
e *Opius* Wesmael (Hymenoptera: Braconidae), parasitóides de moscas-das-
frutas (Diptera: Tephritidae)**

Cláudia Fidelis Marinho

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

**Piracicaba
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Cláudia Fidelis Marinho
Bióloga

Análises morfométricas e moleculares de espécies de *Doryctobracon* Enderlein e *Opius* Wesmael (Hymenoptera: Braconidae), parasitóides de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae)

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

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

**Piracicaba
2009**

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

Marinho, Cláudia Fidelis

Análises morfométricas e moleculares de espécies de *Doryctobracon* Enderlein e *Opius* Wesmael (Hymenoptera: Braconidae), parasitóides de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) / Cláudia Fidelis Marinho. - - Piracicaba, 2009.

140 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.
Bibliografia.

1. Biologia (classificação) 2. Diptera 3. Hymenoptera 4. Insetos parasitóides 5. Marcador molecular 6. Morfometria 7. Moscas-das-frutas I. Título

CDD 632.774
M338a

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

“Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor... Lembre-se: se escolher o mundo ficará sem amor, mas se escolher o amor, com ele conquistará o mundo”

Albert Einstein

Com Amor

Dedico

Aos meus pais

José Carlos Marinho e Maria Luci Fidelis Marinho

Pelo incentivo, força e formação que me proporcionaram

E

Aos meus irmãos queridos

Pier Angeli, Marilucy e Roney

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Á Deus, razão maior de nossa existência por toda Luz, Força e por estar comigo em todos os momentos;

Ao Prof. Dr. Roberto Antonio Zucchi pela oportunidade, ensinamentos e orientação durante todos estes anos;

Ao Prof. Dr. Fernando Luís Cômoli pela excelente orientação na área de molecular, sugestões, disponibilidade e ensinamentos passados;

Ao Prof. Dr. Sérgio Furtado dos Reis pertencente ao Laboratório de Parasitologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) Campinas/SP por ter me recebido em seu laboratório e disponibilizado o seu tempo para sanar minhas dúvidas. Agradeço especialmente a sua excelente equipe de trabalho, a M.Sc Rute Garcia Beatriz Clemente e ao Dr. Ivan Perez Morea, pelos ensinamentos e grande auxílio na utilização dos programas de morfometria, nada disso teria sido possível sem vocês;

Agradeço ao Dr. Ricardo Adaime da Silva, Embrapa Amapá, Macapá, AP; Dr. Neliton Marques INPA, Manaus, AM; M.Sc Márcia Reis Pena, INPA, Manaus, AM; Dr. Eduardo R. Hickel, EPAGRI, Itajaí, SC; Dr. Marcos Botton, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS; Dra Valquíria R. S. Veloso, UFG, Goiânia, GO; Dra Gislene A. Ferreira, UFG, Goiânia, GO; Dr. Manoel A. Uchôa-Fernandes, UFGD, Dourados, MS; M.Sc Darcy Alves do Bomfim, UFGD; Dr. Jorge A. Guimarães, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE; Dra Clarice D. A. Corsato, UNIMONTES, Janaúba, MG; Dra Maria A. Bittencourt, UESC, Ilhéus, BA; Dra Ranyse B. Querino, Embrapa Roraima, Boa Vista, RR; Dra Elen de L. A. Menezes, Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ; Dr. Carlos Alfredo L. Carvalho, UFRB, Cruz das Almas, BA, M.Sc Zuzinaide V. Bonfim, M.Sc Tiago C. Lima e M.Sc Tibério Graco ESALQ/USP, Piracicaba; Dr. Adalton Raga; Dr. Miguel F. Souza Filho e Dr. Valmir A. Costa, Instituto Biológico, Campinas, SP pelo o envio de amostras, essenciais para o desenvolvimento do meu trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por ter disponibilizado a bolsa de estudos para minha permanência em Piracicaba;

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

A Dra Marinéia Haddad e a M.Sc Lorena Nunes pelo auxílio nas análises estatísticas;

Ao Prof. Dr. Sinval Silveira Neto pelas valiosas sugestões;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pelas condições inigualáveis para o desenvolvimento dessa pesquisa;

Aos professores do setor de Entomologia da ESALQ/USP, pelos ensinamentos compartilhados;

Às minhas queridas amigas Márcia D’ávila, Vanessa Pires da Rosa, Marisol Giraldo Jaramillo e Janayne Maria Rezende pelo prazer de tê-las conhecido e convivido dividindo casa, durante todos estes anos em Piracicaba, muito obrigada pelo apoio e a linda amizade de vocês;

Às minhas queridas amigas de todos os momentos, Mônica Santos, Gerane Celly, Nívia Dias, Izabela Salvador, Gabriela Salvador, Mariuxi Lorena, Raquel Arôuca, Márcia Reis, Nancy e Regiane Cristina pelas risadas, conversas, estresses compartilhados, apoio e amizade;

Aos colegas do Laboratório Ecologia Nutricional e Molecular de Insetos Gabriela Salvador, Carolina Schultz, Larissa Spoladore, Aline Guidolin, Priscila Fortes, Tibério Graco, Fábio Dossi agradeço pela amizade, convivência, apoio e auxílio no laboratório, em especial, agradeço à Izabela Salvador pelo treinamento nos procedimentos práticos do estudo molecular e pelas inúmeras dúvidas sanadas, obrigada por ter disponibilizado seu tempo para o desenvolvimento de minha pesquisa;

A todos os colegas do setor de Entomologia da ESALQ/USP pela amizade e convívio, em especial ao alegre grupo do Laboratório de Resistência de Plantas e Plantas Inseticidas, onde me considero agregada;

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Gêneros <i>Doryctobracon</i> Enderlein e <i>Opius</i> Wesmael.....	18
2.2 Morfometria multivariada.....	19
2.3 Morfometria geométrica.....	21
2.4 Marcadores moleculares.....	24
2.5 Plasticidade fenotípica.....	27
2.6 Importância dos braconídeos parasitóides de moscas-das-frutas.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Obtenção de parasitóides de moscas-das-frutas.....	33
3.2 Identificação taxonômica de parasitóide de moscas-das-frutas.....	33
3.3 Ilustrações.....	34
3.4 Estudos morfométricos.....	34
3.4.1 Espécies de braconídeos selecionados para o estudo morfométrico.....	34
3.4.2 Coleta de dados morfométricos.....	34
3.4.3 Análise dos dados morfométricos.....	38
3.5 Análises moleculares.....	39
3.5.1 Preparo do material.....	39
3.5.2 Extração do DNA.....	40
3.5.3 Amplificação da região do ITS2 rDNA e segmento de expansão D2 do 28S rDNA.....	40
3.5.4 Clonagem e sequenciamento.....	42
3.5.5 Alinhamento e análise das sequências.....	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1 Caracterização morfológica de <i>Doryctobracon areolatus</i> (Szépligeti) e duas espécies relacionadas.....	45

4.2 Caracterização morfológica de <i>Opius bellus</i> Gahan e <i>Opius</i> sp.	50
4.3 Análises morfométricas.....	53
4.3.1 <i>Doryctobracon</i>	53
4.3.1.1 Análises das variáveis canônicas (AVC).....	54
4.3.1.2 Análise de agrupamento.....	65
4.3.1.3 Considerações geográficas.....	69
4.3.1.4 Dimorfismo sexual.....	70
4.3.2 <i>Opius</i>	74
4.3.2.1 Análises das variáveis canônicas (AVC).....	74
4.3.2.2 Análise de agrupamento.....	78
4.3.2.3 Considerações geográficas.....	79
4.3.2.4 Dimorfismo sexual.....	81
4.4 Análises moleculares.....	83
4.4.1 <i>Doryctobracon</i>	83
4.4.2 <i>Opius</i>	92
4.5 Análises morfométricas e moleculares.....	104
5 CONCLUSÕES.....	107
REFERÊNCIAS.....	108
ANEXOS.....	126

RESUMO

Análises morfométricas e moleculares de espécies de *Doryctobracon* Enderlein e *Opius* Wesmael (Hymenoptera: Braconidae), parasitóides de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae)

Este trabalho teve por objetivo esclarecer a identidade de duas espécies próximas a *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti) e de uma relacionada a *Opius bellus* Gahan, mencionada na literatura nacional como *Opius* sp. aff. *bellus*, por meio da morfometria geométrica e da análise das regiões do ITS2 do rDNA e 28S rDNA D2. As medidas das asas de *D. areolatus*, *Doryctobracon* sp. 1 e *Doryctobracon* sp. 2, *O. bellus* e *Opius* sp. aff. *bellus*, provenientes de diversas localidades brasileiras, foram estudadas por meio da morfometria geométrica. A avaliação de 20 pontos anatômicos nas asas, por meio de análise multivariada revelou a existência de variabilidade interpopulacional em 11 populações de *D. areolatus*, provenientes de localidades das cinco regiões brasileiras. O estudo morfométrico ainda revelou que *Doryctobracon* sp. 1 (estigma claro) e *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro) diferem entre si e também de *D. areolatus* (Szépligeti). No entanto, entre os espécimes de *O. bellus* Gahan e *Opius* sp. aff. *bellus*, os resultados apontaram a coespecificidade desses indivíduos. Com base no tamanho do centróide, os resultados apontam a existência de dimorfismo sexual em relação ao tamanho das asas, ou seja, as fêmeas possuem asas relativamente maiores que as dos machos. Nas análises moleculares, os resultados indicaram a ocorrência de variabilidade intraespecífica, com relação ao tamanho do fragmento entre as populações de *D. areolatus* provenientes dos estados do AP, SP, GO e TO com a utilização dos dois marcadores moleculares (ITS2 e 28S rDNA D2). Porém, entre os espécimes de *Doryctobracon* sp. 1 (estigma claro) e de *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro), essas regiões não variaram quanto ao tamanho, mas diferiram na composição das sequências, revelando que correspondem realmente a duas espécies. Portanto, houve congruência entre os resultados morfométricos e moleculares para essas espécies de *Doryctobracon*. Entre os espécimes identificados como *Opius bellus* e *Opius* sp. aff. *bellus*, a região do ITS2 indicou a ocorrência de variabilidade intrapopulacional, semelhante à interpopulacional, com elevada similaridade entre as morfoespécies analisadas. No entanto, a região do 28S rDNA D2 apresentou elevada similaridade entre as sequências obtidas, fortalecendo as indicações de que os espécimes considerados como *O. bellus* Gahan e *Opius* sp. aff. *bellus*, na realidade, pertencem à uma única espécie, conclusão também sustentada pelas análises morfométricas.

Palavras-chave: Morfometria geométrica; Análise de variáveis canônicas; ITS2, 28S rDNA D2; Caracterização molecular; Taxonomia

ABSTRACT

Morphometric and molecular analysis of species of *Doryctobracon* Enderlein and *Opius* Wesmael (Hymenoptera: Braconidae), parasitoids of fruit flies (Diptera: Tephritidae)

This study aimed to elucidate the identity of two-closely related species of *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti) and a closely related species of *Opius bellus* Gahan, commonly referred to as *Opius* sp. aff. *bellus*, by using geometric morphometry and molecular analysis (ITS2 rDNA and 28S rDNA D2 regions). The analysis based on 20 landmarks through the multivariate analysis (CVA) revealed the existence of interpopulation variability in the wing morphology of 11 populations of *D. areolatus*, from five Brazilian regions. The morphometric study also showed that specimens of *Doryctobracon* sp. 1 (clear stigma) and *Doryctobracon* sp. 2 (dark stigma) were distinct between themselves and also from *D. areolatus* (Szépligeti). However, specimens of *O. bellus* Gahan and *Opius* sp. aff. *bellus* were found to be conspecifics. Analysis based on the centroid size indicated the existence of sexual dimorphism in relation to the size of the wings, ie, females had relatively larger wings than males. The molecular analysis indicated intraspecific variability in the size of the fragment between populations of *D. areolatus* from Amapá, São Paulo, Goiás and Tocantins states for both of the molecular markers used (ITS2 and 28S D2 rDNA). But these markers had similar sizes for *Doryctobracon* sp. 1 (stigma clearly) and *Doryctobracon* sp. 2 (dark stigma), with a very different base composition, indicating the existence of two distinctive species. Both molecular and morphometric analysis gave similar results. Among the specimens identified as *Opius bellus* and *Opius* sp. aff. *bellus*, analysis of the ITS2 region indicated the intrapopulation variability was similar to the interpopulation, with high similarity between the morphospecies analyzed. However, the region of the 28S D2 rDNA showed high similarity between the sequences obtained, reinforcing the indication that the specimens taken as *O. bellus* Gahan and *Opius* sp. aff. *bellus* in fact, belong to the same species, which was also supported by morphometric analysis.

Keywords: Geometric morphometry; Canonical variates analysis; ITS2, 28S rDNA D2; Molecular characterization; Taxonomy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Locais das amostras dos braconídeos.....	35
Figura 2 -	Marcos anatômicos e descrição das nervuras da asa anterior de <i>Doryctobracon areolatus</i>	36
Figura 3 -	Marcos anatômicos e descrição das nervuras da asa anterior de <i>Opius bellus</i>	37
Figura 4 -	Descrição das nervuras e setores da asa anterior da família Braconidae, baseado em (SHARKEY; WHARTON, 1997).....	38
Figura 5 -	Esquema da unidade de repetição do rDNA, com as seguintes regiões, ETS – espaçador externo; ITS – espaçador interno; 28S – região que codifica para 28S rDNA, com detalhe dos segmentos presentes nesta região, inclusive com D2 utilizado; NTS – espaçador não transcrito; 18S – região que codifica para 18S rDNA; 5.8S – região que codifica para o 5.8S; IGS – espaçador intergênico (Figura adaptada de Melen et al., 1999).....	41
Figura 6 -	<i>Doryctobracon areolatus</i> . A. Cabeça, vista frontal (170x); B. Cabeça vista parcial (b1. Clípeo; b2. espaço entre clípeo e mandíbulas) (272X); C. Mesossoma, vista dorsal (c1. notáulices completas e não crenuladas; c2. sulco pré-escutelar com uma carena mediana transversal (105x); D. Propódeo (d1. Carena médio-anterior curta; d2 aréola) (263x); E. Cabeça e mesossoma, mesopleura lisa (seta), vista lateral (87x); F. Base do gáster (seta), vista dorsal (263x); G. Asa anterior.....	46
Figura 7 -	<i>Doryctobracon</i> sp. 1. A. Cabeça, vista frontal (59x); B. Cabeça vista parcial (b1. Clípeo; b2. espaço entre clípeo e mandíbulas) (131x); C. Mesossoma, vista dorsal (c1. notáulices completas e não crenuladas; c2. sulco pré-escutelar com uma carena mediana transversal (38x); D. Propódeo (d1. Carena médio-anterior curta; d2 aréola) (113x); E. Cabeça e mesossoma, mesopleura lisa, vista lateral (35x); F. Detalhe da mesopleura lisa (seta) (58x); G. Asa anterior.....	47

- Figura 8 - *Doryctobracon* sp. 2. A. Cabeça, vista frontal (47x); B. Cabeça vista parcial (b1. Clípeo; b2. espaço entre clípeo e mandíbulas) (88x); C. Mesossoma, vista dorsal (c1. notáulices completas e não crenuladas; c2. sulco pré-escutelar com uma carena mediana transversal (38x); D. Propódeo (d1. Carena médio-anterior curta; d2 aréola) (78x); E. Cabeça e mesossoma, mesopleura lisa (seta), vista lateral (36x); F. Base do gáster (seta), vista dorsal (62x); G. Asa anterior..... 48
- Figura 9 - Braconídeos parasitóides de moscas-das-frutas. A. *Doryctobracon areolatus*; B. *Doryctobracon* sp. 1 (Amapá); C. *Doryctobracon* sp. 2 (Goiás); D. *Doryctobracon* sp. 2 (Tocantins); E. *Doryctobracon* sp. 2 (Amapá). Ver detalhe da faixa hialina e variação na coloração das pernas posteriores (as figuras não estão em uma mesma escala)..... 49
- Figura 10 - *Opius bellus*. A. Cabeça, vista frontal (252x); B. Cabeça vista parcial (b1. protuberância mediana; b2. Clípeo; b3. abertura entre clípeo e mandíbula ausente) (304x); C. Mesossoma, vista dorsal (c1. notáulices ausentes; c2. sulco pré-escutelar com três carenas transversais (123x); D. propódeo (d1. propódeo liso; d2. carena médio-longitudinal) (275x); E. Cabeça e mesossoma, mesopleura lisa (seta), vista lateral (135x); F. Base do gáster (seta), vista dorsal (62x); G. Asa anterior..... 51
- Figura 11 - A. *Opius* sp.; B. *Opius bellus*; C. tíbia posterior, clara; D. tíbia posterior, escura; E. antena, ápice escuro; F. antena, ápice claro (as figuras não estão em uma mesma escala)..... 52
- Figura 12 - Gráfico de dispersão de machos e fêmeas de *D. areolatus* do Norte (AM, AP), Centro-Oeste (GO, TO) e Nordeste (CE, RN, BA) no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas após análise de coordenadas posicionais em plano cartesiano de 20 pontos anatômicos da asa. Os diagramas de deformações ao redor do gráfico indicam as conformações alares presumíveis para indivíduos situados no extremo superior e inferior das variáveis canônicas. As magnitudes das deformações foram aumentadas em 3X para visualização..... 57

- Figura 13 - Gráfico de dispersão para machos e fêmeas de *D. areolatus* do Sul (SC) e Sudeste (MG, SP, RJ) no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas após análise de coordenadas posicionais em plano cartesiano de 20 pontos anatômicos da asa. Os diagramas de deformações ao redor do gráfico indicam as conformações alares presumíveis para indivíduos situados no extremo superior e inferior das variáveis canônicas. As magnitudes das deformações foram aumentadas em 3X para visualização..... 60
- Figura 14 - Gráfico de dispersão de machos e fêmeas de *Doryctobracon areolatus* (AP, TO, GO, SP) *Doryctobracon* sp. 1 (AP) (DCAP), *Doryctobracon* sp. 2 (AP, GO) (DEAP e DEGO) no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas após análise de coordenadas posicionais em plano cartesiano de 20 pontos anatômicos da asa. Os diagramas de deformações ao redor do gráfico indicam as conformações alares presumíveis para indivíduos situados nos extremos superior e inferior das variáveis canônicas. As magnitudes das deformações foram aumentadas em 3X para visualização..... 64
- Figura 15 - Dendograma para machos e fêmeas de *D. areolatus* do Norte (AM, AP), Centro-Oeste (GO, TO), Nordeste (CE, RN, BA) Sudeste (MG, SP, RJ) e Sul (SC), *Doryctobracon* sp. 1 (estigma claro) (DCAP), *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro) (DEAP e DEGO) gerados por análise de *cluster* (UPGMA) a partir de distâncias de Mahalanobis apresentadas na Tabela 3..... 67
- Figura 16 - Tabela de médias e desvios-padrão dos tamanhos dos centróides calculados a partir das asas (A) machos e (B) fêmeas de *Doryctobracon areolatus* (GO, TO, BA, CE, RN, AM, AP, MG, RJ, SP, SC) e *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro) (AP, GO)..... 73
- Figura 17 - Gráfico de dispersão para fêmeas e machos de *Opius bellus* e *Opius* sp. do AP, AM, RN no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas após análise de coordenadas posicionais em plano cartesiano de 20 pontos anatômicos da asa. Os diagramas de deformações ao redor do gráfico indicam as conformações alares presumíveis para indivíduos situados no extremo superior e inferior das variáveis canônicas. As magnitudes das deformações foram aumentadas em 3X para visualização..... 77

- Figura 18 - Dendograma para fêmeas e machos de *Opius bellus* e *Opius* sp. do RN, AM, AP gerados por análise de cluster (UPGMA) a partir de distâncias de Mahalanobis apresentadas na Tabela 5..... 79
- Figura 19 - Médias e desvios-padrão dos tamanhos dos centróides calculados a partir das asas de machos (A) e fêmeas (B) de *Opius bellus* e *Opius* sp. coletados no RN, AM e AP..... 82
- Figura 20 - Árvores linearizadas de Neighbour-Joining (NJ) de *Doryctobracon* sp. 1 (AP), *Doryctobracon* sp. 2 (AP, GO, TO) e *D. areolatus* (AP, GO, TO, SP), produzidas a partir da análise de sequências de nucleotídeos (A) porção ITS2 e (B) porção 28S rDNA D2..... 88
- Figura 21 - Árvores linearizadas de Neighbour-Joining (NJ) para populações de *Opius bellus* e *Opius* sp. produzidas a partir da análise de sequências de nucleotídeos da porção 28S rDNA D2. (legendas ver Tabela 9)..... 97
- Figura 22 - (A) *Opius bellus* originário do AM, sem manchas no corpo e (B) *Opius bellus* originário RS com manchas enegrecidas no pronoto, mesoescuto, mesopleura e tergitos do gáster..... 103
- Figura 23 - Comparação entre os métodos: molecular ITS2 (esquerda) construído (MEGA 4.0) com UPGMA análise de cluster com distância de Mahalanobis (direita) de *D. areolatus* (AP, GO, TO, SP), *Doryctobracon* sp. 1 (estigma claro) (DCAP) e *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro) (DEAP, DEGO e DETO somente molecular) calculados a partir dos componentes de forma das asas..... 105
- Figura 24 - Comparação entre os métodos: molecular 28S rDNA D2 (esquerda) construído (MEGA 4.0) com UPGMA análise de cluster com distância de Mahalanobis (direita) de *D. areolatus* (AP, GO, TO, SP), *Doryctobracon* sp. 1 (estigma claro) (DCAP) e *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro) (DEAP, DEGO e DETO somente molecular) calculados a partir dos componentes de forma das asas..... 106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Espécies de braconídeos, plantas hospedeiras de moscas-das-frutas e localidades.....	44
Tabela 2 -	Procedência dos braconídeos (<i>Doryctobracon</i>) e respectivos códigos.....	53
Tabela 3 -	Distâncias de Mahalanobis de machos e fêmeas de <i>D. areolatus</i> do Norte (AM, AP), Centro-Oeste (GO, TO), Nordeste (CE, RN, BA) Sudeste (MG, SP, RJ) e Sul (SC), <i>Doryctobracon</i> sp. 1 (estigma claro) (DCAP), <i>Doryctobracon</i> sp. 2 (estigma escuro) (DEAP e DEGO) calculados a partir dos componentes de forma das asas.....	68
Tabela 4 -	Procedência dos braconídeos (<i>Opius</i>) e respectivos códigos.....	74
Tabela 5 -	Distâncias de Mahalanobis de fêmeas e machos de <i>Opius bellus</i> e <i>Opius</i> sp. do RN, AM, AP, calculada a partir dos componentes de forma das asas.....	78
Tabela 6 -	Tamanho do fragmento dos marcadores ITS2/28SD2 para as espécies de <i>Doryctobracon</i>	84
Tabela 7 -	Composição nucleotídica, tamanho e conteúdo G+C (guanina + citosina) para as sequências obtidas pelo ITS2 e 28S rDNA D2 de <i>D. areolatus</i> (AP, GO, TO, SP), <i>Doryctobracon</i> sp. 1 (AP) e <i>Doryctobracon</i> sp. 2 (AP, GO, TO).....	86
Tabela 8 -	Matriz de similaridade genética da porção ITS2 (diagonal superior) e 28S rDNA D2 (diagonal inferior) das populações <i>D. areolatus</i> (AP, GO, TO, SP), <i>Doryctobracon</i> sp. 1 (AP) e <i>Doryctobracon</i> sp. 2 (AP, GO, TO).....	89
Tabela 9 -	Tamanho do fragmento dos marcadores em <i>Opius bellus</i> e <i>Opius</i> sp.: A - tíbia clara/antena clara, B - tíbia clara/antena escura, C - tíbia escura/antena escura e D - tíbia escura/antena clara.....	94
Tabela 10 -	Composição nucleotídica, tamanho e conteúdo G+C (guanina + citosina) para as sequências obtidas pelo ITS2 e 28S rDNA D2 de <i>Opius bellus</i> e <i>Opius</i> sp. (legendas ver Tabela 9).....	96
Tabela 11 -	Matriz de similaridade genética da porção ITS2 rDNA de <i>O. bellus</i> e <i>Opius</i> sp.	99
Tabela 12 -	Matriz de similaridade genética da porção 28S rDNA D2 de <i>O. bellus</i> e <i>Opius</i> sp.	100

1 INTRODUÇÃO

Os himenópteros parasitóides são os agentes mais frequentemente utilizados em programas de controle biológico (DE BACH; ROSEN, 1991). Todavia, muitas vezes, a identificação e classificação podem ser difíceis (GAULD, 1986), pois os parasitóides exibem uma ampla variabilidade intraespecífica e comumente são encontrados complexos de espécies crípticas (ATANASSOVA et al., 1998). A eficácia do controle biológico pode ser claramente afetada pela identificação incorreta do parasitóide, uma vez que o objetivo final, controlar a praga, não é alcançado (ZUCCHI, 2002). A família Braconidae (Hymenoptera) contém a subfamília Opiinae, cujas espécies parasitam as moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae), assim, muitas delas são utilizadas em programas de controle biológico no mundo (OVRUSKI et al., 2000).

No Brasil, estão registradas 13 espécies associadas às moscas-das-frutas (CANAL; ZUCCHI, 2000), entretanto, ainda há dúvidas sobre a identificação de algumas espécies. Assim, decorridas quase duas décadas, ainda não foi esclarecida a identidade de alguns exemplares, que têm sido denominados de *Opius* sp. ou *Opius* sp. aff. *bellus*, na literatura brasileira. Esses exemplares diferem dos de *O. bellus* Gahan pela coloração das tíbias posteriores e, assim, há divergência entre os taxonomistas, se pertenceriam à uma espécie ou se seriam variação intraespecífica de *O. bellus*. Também a identidade de uma espécie de *Doryctobracon* ainda não foi devidamente elucidada, após mais de uma década da sua descoberta. Essa espécie e outra, encontrada durante o desenvolvimento deste estudo, são muito próximas a *D. areolatus* (Szépligeti), espécie amplamente distribuída no Brasil. Apesar de os exemplares dessas duas espécies apresentarem sutis diferenças que as distinguem de *D. areolatus* (Szépligeti), ambas ainda não foram formalmente descritas.

Portanto, este estudo tem por objetivo esclarecer a identidade de *Opius* sp. aff. *bellus* e das duas espécies próximas a *D. areolatus*, com base na morfometria geométrica e nas análises moleculares, por meio da região do ITS2 do rDNA e 28S rDNA D2.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gêneros *Doryctobracon* Enderlein e *Opius* Wesmael

O nome *Parachasma* foi proposto por Fischer (1967) para um grupo de espécies neotropicais (Opiinae), que parasitavam moscas da família Tephritidae, no entanto, este nome foi estabelecido como sinonímia de *Doryctobracon* Enderlein (FISCHER, 1977). A partir de então, chaves para as espécies (WHARTON; MARSH, 1978; WHARTON; GILSTRAP, 1983), diagnose do gênero para reclassificação na subfamília Opiinae (WHARTON, 1988), atualização da chave do gênero (WHARTON, 1997a) e redescrição (WHARTON, 1997b) foram elaboradas.

O gênero *Doryctobracon* é conhecido apenas nas Américas, ocorrendo desde o sul dos EUA, Caribe até a Argentina (OVRUSKI, 2003). Dez espécies estão associadas com moscas-das-frutas: *Doryctobracon anastrephilus* (Marsh, 1970), *D. areolatus* (Szépligeti, 1911), *D. auripennis* (Muesebeck, 1958), *D. brasiliensis* (Szépligeti, 1911), *D. capsicola* (Muesebeck, 1958), *D. crawfordi* (Viereck, 1911), *D. fluminensis* (Costa Lima, 1938), *D. toxotrypanae* (Muesebeck, 1958), *D. trinidadensis* (Muesebeck, 1958), *D. zeteki* (Muesebeck, 1958) (WHARTON, 1997b; <http://hymenoptera.tamu.edu>). Morfologicamente, as espécies do gênero caracterizam-se por apresentar o bordo anterior do clípeo sinuoso; ausência de carena occipital; carena dorsal entre pronoto e mesonoto bem desenvolvida; segunda célula cubital curta; nervura m-cu alcançando a primeira célula cubital na asa anterior e m-cu presente na asa posterior (WHARTON; MARSH, 1978; WHARTON, 1988; WHARTON, 1997b; OVRUSKI, 2003).

Doryctobracon areolatus (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae), desenvolve-se nas larvas de espécies de *Anastrepha* Schiner (Diptera: Tephritidae). É o parasitóide de moscas-das-frutas mais comum da região Neotropical, ocorrendo desde o México à Argentina. Atualmente, é o parasitóide dominante da região sul-central da Flórida (EUA), por ter sido introduzido em 1969 para o controle de *Anastrepha suspensa* (Loew) (WHARTON; MARSH, 1978; OVRUSKI et al., 2000; EITAM et al., 2003). *D. areolatus* é considerado um dos parasitóides mais importantes no controle de moscas-das-frutas. No Brasil, destaca-se, pela presença constante e maior número de exemplares obtidos, na maioria dos levantamentos

realizados no país e pela agressividade no parasitismo de larvas de moscas-das-frutas de diversos estágios (LEONEL JUNIOR, 1995; MATRANGOLO et al., 1998; CANAL; ZUCCHI, 2000).

O gênero *Opius* Wesmael é considerado um dos maiores e mais complexos da família Braconidae, com aproximadamente 800 espécies distribuídas em todo mundo e cerca de 21 sinonímias. Reúne espécies de parasitóides Agromyzidae, Anthomyiidae, Chloropidae, Drosophilidae, Ephydriidae, Loncheidae, Scathophagidae e Tephritidae (WHARTON; MARSH, 1978; WHARTON, 1983; WHARTON, 1988; WHARTON, 1997a; OVRUSKI, 2003). O gênero foi dividido por Fischer (1964) em grupos e subgrupos, baseando-se nas diferenças de coloração e comprimento do ovipositor. Porém, essa classificação foi considerada problemática por WHARTON; MARSH (1978), uma vez que o gênero é complexo e apresenta grande número de grupos morfológicos distintos. Assim o gênero foi dividido em sete subgêneros e dois grupos de espécies (grupo *bellus* e grupo *parvulus*). O grupo *bellus* foi descrito por Wharton (1997b), como um táxon diferente, elevando-o à categoria de subgênero, denominando-o *Bellopius* Wharton. Esse subgênero é constituído por espécies neotropicais associadas a tefritídeos e é reconhecido pela ausência da carena occipital e notáulices, clipeo ocultando o labro, mandíbulas sem dentes basais, asa anterior com nervura m-cu alcançando a primeira célula submarginal (1st), presença da nervura (RS+M)b, segunda célula submarginal alongada (2nd), asa posterior sem segmento m-cu (WHARTON, 1997b; OVRUSKI, 2003). São conhecidas oito espécies de *Opius* que parasitam tefritídeos: *Opius baldufi* Muesebeck, *O. bellus* Gahan, *O. bucki* Costa Lima, *O. downesi* Gahan, *O. froggatti* Fullaway, *O. hirtus* Fischer, *O. tafivallensis* Fischer e *O. mariae* Tobias (espécie paleártica mantida em posição isolada dos Opiinae) (WHARTON, 1997b).

Opius bellus foi considerada por Wharton (1983) como parte de um conjunto de espécies próximas denominado grupo *bellus* e o caracterizou pela ausência de carena occipital. Foi descrito, no Brasil, por Costa Lima (1938) como *O. gomesi*, e na Argentina como *O. turicai* por Blanchard (1966), sendo seus nomes sinonimizados como *O. bellus* por WHARTON; MARSH (1978).

2.2 Morfometria multivariada

A morfometria multivariada é uma ferramenta útil em biologia evolutiva para detectar variação em caracteres quantitativos, para avaliar padrões de relação fenética, e em alguns casos,

para testar hipóteses filogenéticas históricas (REIS, 1988). O termo foi definido por Blackith e Reyment (1971) para o uso de análises multivariadas em morfometria. A complexidade dos padrões de variação morfométrica dos organismos requer o uso de análises multivariadas que permitam considerar os padrões de variação e covariação simultâneos de um conjunto de caracteres quantitativos (CAVALCANTI; LOPES, 1998). As análises multivariadas, em especial a Análise dos Componentes Principais, das Variáveis Canônicas e das Funções Discriminantes, são extremamente úteis na ordenação dos dados morfométricos, permitindo que parâmetros biológicos subjacentes às relações morfológicas entre indivíduos ou grupos possam ser mais facilmente detectados e interpretados (BLACKITH; REYMENT, 1971; REIS, 1988).

Para distinguir a variação entre os grupos é utilizada a Análise das Variáveis Canônicas (AVC), que é similar à Análise dos Componentes Principais (ACP), exceto pelo fato dos grupos serem definidos *a priori*¹ e as correlações entre as variáveis não serem consideradas (CAVALCANTI; LOPES, 1993). A AVC fornece uma descrição das diferenças entre os grupos especificados *a priori*, em um conjunto de dados multivariados. Por meio da AVC, é possível verificar a relação da magnitude de diferenças entre os grupos e aquela dentro de cada grupo. A AVC maximiza a variação entre os grupos relativa à variação dentro dos grupos, sabendo-se que os autovetores de uma matriz de variâncias e covariâncias descrevem os eixos de variação máxima (MONTEIRO; REIS, 1999). Isto favorece a formação dos grupos. A AVC mostra-se bastante apropriada para estudos em sistemática por permitir maximizar a separação entre grupos e indicar caracteres que mais contribuem para a discriminação dos grupos de organismos ao longo de cada variável canônica (BLACKITH; REYMENT, 1971). Na ACP, cada componente é uma combinação linear dos caracteres morfométricos. O número dos componentes principais pode ser igual ao número de caracteres selecionados, porém, somente dois ou três primeiros são interpretados em senso biológico, pois eles explicam a maior porcentagem de variação nos dados (REYMENT; BLACKITH; CAMPBELL, 1981). Esta técnica não requer um agrupamento dos espécimes *a priori*, pois é uma técnica de ordenação exploratória. Consequentemente revela um padrão total, mas não distingue variações dentro dos grupos (THORPE, 1976). Esses dois métodos de estatística multivariada (AVC e ACP) são aplicados em princípio a dados que diferem em sua estruturação em termos da existência de grupos, entretanto, os objetivos fundamentais são os mesmos, ou seja, a redução da dimensionalidade e a explicação da variação morfológica em função de um menor número de variáveis latentes (componentes principais ou

¹ isto é, no conjunto de dados analisados através de AVC são especificados a qual das populações sob a análise se referem cada conjunto de variáveis.

variáveis canônicas), construídas a partir dos autovetores, permitindo a interpretação da natureza da variação morfológica quanto a ordenação de populações (MONTEIRO; REIS, 1999).

Em parasitóides de moscas-das-frutas do gênero *Psytalia* Walker (Hymenoptera: Braconidae), um grande número de espécies apresenta morfologia similar, dificultando o estabelecimento de suas identidades. Populações alopátricas provenientes de café de várias localidades geográficas foram comparadas por meio da morfologia das asas e acúleo. Com base na morfometria multivariada, foi possível separar espécies morfologicamente indistinguíveis por meio da análise das medidas das nervuras da asa anterior (BILLAH et al., 2008). Análises multivariadas também foram utilizadas em populações alopátricas do complexo de espécies *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae), composto por *C. flavipes* Cameron, *C. sesamiae* (Cameron) e *C. chilonis* (Matsumura). A AVC indicou claramente a formação de três grupos nesse complexo de espécies (KIMANI-NJOGU et al., 1997).

2.3 Morfometria geométrica

Durante muito tempo, o termo morfometria foi utilizado indiscriminadamente para qualquer estudo que analisasse quantitativamente a variação morfológica encontrada nos organismos. Essa palavra foi cunhada por Blackith (1965) para designar os métodos que serviam para medir a distância de forma entre as espécies e, assim, construir fenogramas. Todavia, há 15 anos, a revolução dessa metodologia fez com que aparecesse a necessidade de um embasamento teórico, filosófico, que culminou na criação de uma área de pesquisa na fronteira entre a biologia, a estatística e a geometria (MONTEIRO; REIS, 1999). Bookstein (1991) foi um dos maiores responsáveis pela revolução morfométrica definindo a morfometria como “o estudo estatístico da covariância entre mudanças de forma e fatores casuais”, porém, após a incorporação de conceitos geométricos a definição de “forma” passou a ser “todas as propriedades de uma configuração de pontos que não se alteram por efeito de tamanho, posição e orientação”.

A morfometria geométrica permite uma análise rigorosa da variação da forma de uma determinada estrutura em organismos de tamanhos variados, principalmente quando utiliza métodos de estatística multivariada. A aplicação mais comum da morfometria consiste na identificação das configurações dos marcos anatômicos, nos diversos caracteres morfológicos

presentes (KLINGENBERG, 2002). Assim, o passo inicial para o estudo morfométrico é a definição dos pontos no corpo dos organismos investigados, de modo que sejam homólogos, sendo também denominados de marcos anatômicos. Esses são interpretados como um meio de reduzir a forma de uma estrutura, ou do organismo como um todo em um conjunto de pontos que marcam seus traços gerais. Por essa razão, é importante que os marcos anatômicos utilizados sejam assumidos como homólogos entre os indivíduos de uma população. Quando se compara indivíduos de uma espécie, o estabelecimento da homologia dos pontos é mais fácil, no entanto, ao se estudar indivíduos de várias espécies a homologia torna-se mais difícil. Assim, por meio da sobreposição dos marcos anatômicos, é possível detectar mudanças de forma entre as mesmas estruturas em diferentes organismos (PRETORIUS; CLARK, 2000). Segundo Bookstein (1991) os marcos anatômicos são classificados em três tipos: 1) justaposição de tecidos, que inclui os marcos definidos no espaço onde três estruturas se encontram, como por exemplo, suturas ósseas, ramificações de nervuras de folhas ou estruturas do sistema nervoso; 2) pontos de máxima curvatura ou outros processos morfogenéticos locais, se encontram nessa categoria pontos relativos a extremidades de processos e vales de invaginações; 3) pontos extremos, que estão relacionados a maior distancia que pode ser medida em uma estrutura, como diâmetros, distâncias entre extremidades, intersecção de estruturas.

A morfometria geométrica é capaz de descrever e localizar claramente as regiões de mudanças de forma e, sobretudo, de reconstruir e restituir graficamente essas diferenças. Ao contrário, na morfometria tradicional, a variação da forma é estudada por meio da covariação de pares de medidas lineares. Nas análises baseadas em pontos de referências, as coordenadas cartesianas desses pontos são as variáveis que capturam as informações sobre a geometria das estruturas estudadas. A vantagem do uso de coordenadas em relação às medidas lineares, é que essas incluem informações sobre as posições relativas, permitindo, desse modo, a reconstrução da forma estudada (ROHLF; MARCUS, 1993). Essas análises baseadas em pontos de referência incluem a eliminação do tamanho, assim como os efeitos de localização no espaço e orientação da estrutura. Retirando-se esses três efeitos, as diferenças observadas podem ser atribuídas somente à forma. Essa transformação é baseada em uma medida geral multivariada de tamanho e não por meio de uma medida única, como observados em índices de indicadores de tamanho. Além disso, pode-se detectar a localização de mudanças na forma, com o deslocamento de alguns pontos em relação a outros, permitindo a visualização das diferenças de forma (MONTEIRO;

REIS, 1999). Os procedimentos de morfometria geométrica estão detalhados em ampla literatura (BOOKSTEIN, 1989, 1991, 1996; ROHLF; SLICE, 1990; ROHLF; BOOKSTEIN, 1991; ROHLF, 1998; MONTEIRO; REIS, 1999).

Um dos métodos mais empregados na morfometria geométrica, para avaliar e visualizar mudanças em configurações de pontos de referência é o de funções de deformações de placas finas (BOOKSTEIN, 1989). Essas funções, baseadas em um modelo físico de deformação de uma placa de metal de espessura desprezível e infinitamente grande, permitem descrever as diferenças entre duas conformações de pontos como uma deformação contínua. Na prática, é como se em uma placa de metal fossem marcados pontos de referência da forma a ser comparada. Essa placa é então deformada de modo que seus pontos encaixem sobre os pontos da forma a qual está sendo comparada. A força feita para deformar a placa é uma quantificação das diferenças entre as formas, sendo que as formas similares necessitarão de pouca deformação, e, portanto, pouca energia envolvida, enquanto formas muito divergentes envolverão uma quantidade maior de energia para realizar a deformação (MONTEIRO; REIS, 1999). Assim, podem-se descrever quantitativamente as diferenças entre duas formas através de grades de deformação como as descritas por Thompson (1917). Os detalhes sobre as análises de deformações encontram-se em (BOOKSTEIN, 1991; MONTEIRO; REIS, 1999).

A morfometria geométrica tem sido utilizada com sucesso na biologia evolutiva, antropologia física, paleontologia e sistemática (CORTI; AGUILERA; CAPANNA, 1998; MONTEIRO et al., 2002; DUJARDIN; LE PONT; BAYLAC, 2003; FRIESS; BAYLAC, 2003; PRETORIUS, 2005; SHIPUNOV; BATEMAN, 2005) Quando inserida em um contexto evolutivo encontra uma larga aplicação, especialmente nas análises em que permite identificar discrepâncias de tamanho e forma entre os organismos, o que torna possível correlacioná-las às variações geográficas, sazonais e demográficas (BITNER-MATHÉ; PEIXOTO; KLACZKO, 1995). Em insetos, a morfometria geométrica e a tradicional merecem destaque na detecção de variações intra e interespecíficas (MENDONÇA; REIS, 1991; IMASHEVA et al., 1995). Embora essa técnica seja suficientemente poderosa na resolução de complexos problemas taxonômicos, os exemplos dessa metodologia como instrumento de discriminação em Hymenoptera são poucos (VILLEMANT; SIMBOLOTTI; KENIS, 2007). Têm sido investigadas sutis diferenças morfológicas entre os grupos, *a priori* definidas por dados biológicos ou que tenham sido consideradas espécies válidas (RINDERER, 1998; QUERINO; MORAES; ZUCCHI, 2002). Um

exemplo sobre a morfometria geométrica aplicada à venação de asas, com objetivo de discriminar as espécies de braconídeos, foi realizado por Baylac et al. (2003). Esses autores analisaram a forma e venação das asas de *Bassus tumidulus* Nees e de *B. tegularis* Thomson (Hymenoptera: Braconidae), que apresentavam sutis diferenças na área de inserção das antenas e forma do escapo. Porém, as asas foram utilizadas na discriminação dessas espécies pela facilidade na determinação da homologia dos pontos, que não foi possível encontrar nas outras estruturas analisadas. Villemant; Simbolotti; Kenis (2007) utilizaram a morfometria geométrica das nervuras da asa do complexo de espécies crípticas de *Eubazus* (Hymenoptera: Braconidae), parasitóide de gorgulhos do gênero *Pissodis* (Coleoptera: Curculionidae), confirmando a divisão já conhecida das quatro espécies investigadas, *E. strigitergum* (Cushman), *E. robustus* (Ratzeburg), *E. semirugosus* (Nees), *E. abieticola* Achterberg & Kenis. Por causa da homologia encontrada entre os pontos numa estrutura analisada, a morfometria torna-se um forte instrumento para discriminação pela utilização das coordenadas cartesianas, sendo as variações morfológicas mínimas detectadas, levando-se em conta as relações espaciais entre os marcos anatômicos, proporcionando resultados estatísticos consistentes.

Os programas para análises de morfometria geométrica são distribuídos livremente pela internet na página de morfometria de Stony Brook (<http://life.bio.sunysb.edu/morph>).

2.4 Marcadores moleculares

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

desenvolvimento de sistemas de marcadores de DNA, um maior nível de polimorfismo pode ser obtido, além das mutações nos íntrons e codões fornecerem maior nível de variação que os marcadores de proteínas (BEHURA, 2006). As amostras de DNA são mais estáveis, tornando os marcadores de DNA o parâmetro mais comum para medir diferenças genéticas entre indivíduos, ou dentro e entre espécies relacionadas e populações. Os avanços sem precedentes da biologia molecular, em especial dos marcadores genéticos, criaram aplicações úteis, em especial na ecologia de insetos (HOY, 2003). O aperfeiçoamento das técnicas tem sido realizado para aumentar a reprodutibilidade, poder de resolução, ou seja, capacidade de revelar polimorfismos mais informativos de um menor número de locos e o mais importante, diminuir os custos e o tempo de desenvolvimento. Desde então, a aplicação dos marcadores de DNA na Entomologia continua passando por mudanças contínuas para acomodar novas tecnologias para métodos mais eficientes e menos dispendiosos (BEHURA, 2006).

Os marcadores moleculares são amplamente empregados, entre os quais, estão isoenzimas, microssatélites de DNA, DNA mitocondrial e os espaçadores de DNA ribossômico ITS e NTS (HILLIS; DIXON, 1991, HILLIS; MORITZ; MABLE, 1996; RODERICK, 1996). O DNA ribossomal (DNAr) é amplamente utilizado na identificação e diferenciação de espécies. Nos organismos eucariontes, o DNAr apresenta unidades transcricionais repetitivas, as quais são separadas por espaços intergênicos (IGS). Dentro de cada unidade transcricional, o “Internal Transcribed Spacer 1” (ITS1) separa a pequena unidade 18S da 5,8S, enquanto o “Internal Transcribed Spacer 2” (ITS2) separa a unidade 5,8S da grande subunidade 28S. As regiões codantes apresentam pequena divergência entre espécies próximas, entretanto, as regiões ITS podem apresentar maior variabilidade (WEEKERS; DE JONCKHEERE; DUMONT, 2001). Assim, a unidade do DNAr apresenta componentes em sua sequência que envolvem variações e podem ser usadas em estudos de sistemática para diferentes níveis taxonômicos (FOULY; WILKINSON; CHEN, 1997).

Nos insetos, especialmente em Diptera e Hymenoptera, a molécula do 28S rDNA é composta por uma série de elementos nucleares altamente conservados e 13 segmentos de expansão (D1 - D7a, D7b - D12), que variam amplamente, mesmo entre linhagens recentemente divergidas (TAUTZ et al., 1988; BELSHAW; QUICKE, 2002; SCHULMEISTER, 2003; HERATY et al., 2004; GILLESPIE et al., 2005). No entanto, os segmentos de expansão D2 (300-700pb) e D3 (~350pb) são os mais comumente usados nas análises, sendo a porção D3 mais

conservada e pouco utilizada, servindo de suporte para as regiões inferidas pela porção D2. Apesar de os segmentos D2 e D3 serem conservados, sendo o último segmento proporcionalmente maior, pode haver divergências nas porcentagens de regiões semelhantes entre os diferentes grupos taxonômicos. Assim, diversos iniciadores têm sido desenvolvidos para amplificar diferentes porções D2 e D3 da região do 28S rDNA para estudos de sistemática em Hymenoptera (HERATY et al., 2004, GILLESPIE, et al., 2005). Estudos recentes têm focado nos altos níveis de proximidade taxonômica em Hymenoptera Parasítica utilizando dados moleculares (DOWTON; AUSTIN, 1994; DOWTON; AUSTIN; ANTOLIN, 1998; BELSHAW; QUICKE, 1997, 2002; GIMENO; BELSHAW; QUICKE, 1997; BELSHAW et al., 1998, 2001; DOWTON, AUSTIN; ANTOLIN, 1998; WHITFIELD; CAMERON 1998; MARDULYN; WHITFIELD 1999; KAMBHAMPATI; VOLKL; MACKAUER, 2000; DOWTON et al., 2002). Em Hymenoptera, as subfamílias Opiinae e Alysiinae, que reúnem espécies que parasitam moscas-das-frutas (Tephritidae), são estreitamente relacionadas por apresentarem grupos morfológicamente definidos. Esses táxons têm se mostrado adequados para o uso de marcadores genéticos. Assim, o estudo das relações entre o nível genérico dessas subfamílias foram estudadas por Gimeno; Belshaw; Quicke (1997), a partir do uso de dados da sequência de fragmentos de 400pb do DNA, dos genes citocromo b, 16S rDNA e 28S rDNA D2. Aqueles autores verificaram a recuperação de grupos morfológicamente definidos pelo marcador 28S rDNA D2, sugerindo que a expansão de regiões ribossomais podem ser úteis para a reconstrução desse nível filogenético. Dowton; Austin; Antolin (1998) estudaram as relações filogenéticas da família Braconidae, usando dados da sequência de genes 16S rDNA. A grande subunidade ribossomal (16S rDNA) tem sido empregada para inferir relações em uma série de níveis filogenéticos; entretanto, a segunda expansão da subunidade ribossomal (28S rDNA D2) foi usada para recuperar relacionamentos morfológicamente congruentes dentro dos grupos pertencentes aos opiíneos e alisiíneos (BELSHAW; QUICK, 1997). As relações filogenéticas da família Braconidae foram investigadas utilizando sequências homólogas do segmento D2 da região do 28S rDNA, além das regiões 16S rDNA, 18S rDNA e de dados morfológicos, sendo bem sustentada a natureza monofilética de todos os representantes dessa família (SHI; CHEN; VAN ACHTERBERG, 2005). Na superfamília Ichneumonoidea, a região do D2 do 28S rDNA foi utilizada na primeira reconstrução filogenética (BELSHAW et al., 1998). Em Hymenoptera Parasítica e outros organismos, o gene ribossomal 28S DNAr tem provado sua utilidade para a

sistemática molecular (CAMPBELL et al., 2000). Em outros grupos de insetos, os marcadores moleculares também foram utilizados na tentativa de discriminar espécies (SILVA et al. 1999; GALLEGO; GÁLIAN, 2001; TAYLOR et al., 2006), além de confirmar o registro da presença ou ausência de uma determinada espécie em uma localidade (CICIOLA JÚNIOR, 2000). Devido à importância que esses marcadores empregam, o desenvolvimento de iniciadores universais tem sido amplamente estudado. Ji; Zhang; He (2003), com o objetivo de produzir um novo conjunto de iniciadores nucleares para amplificar a região do ITS (região ribossômica do Espaçador Interno Transcrito), fizeram um levantamento extensivo de sequências nucleares ribossomais dos genes 18S/5.8/28S (regiões homólogas e/ou sequências completas e parciais) no banco de dados EMBL, concebendo novos conjuntos universais de iniciadores para a amplificação dessas regiões em insetos e invertebrados em geral. A análise realizada sugeriu que os cinco iniciadores propostos para a região do ITS são altamente conservados entre as sequências de insetos e outros invertebrados, permitindo o isolamento dessas regiões por simples PCR. A tecnologia dos marcadores moleculares está avançando rapidamente onde são adotadas novas formas e abordagens inovadoras aos princípios genéticos existentes na detecção de polimorfismos de DNA. As novas abordagens para a geração da nova classe de marcadores genéticos podem ser encontradas em Behura (2006).

2.5 Plasticidade fenotípica

A plasticidade fenotípica pode ser definida como a capacidade de um mesmo genótipo produzir diferentes fenótipos, em resposta às distintas condições ambientais (PIGLIUCI; MURREN; SCHLICHTING, 2006). Muitas vezes recursos essenciais para os organismos podem tornar-se limitantes em razão das mudanças climáticas. Assim, mudanças nas características bióticas e abióticas podem produzir efeitos drásticos na sobrevivência dos organismos. A mudança no ambiente pode reduzir a aptidão dos indivíduos podendo seus efeitos serem medidos por meio da aptidão de seus descendentes. Essas mudanças podem afetar diretamente a informação genética carregada pelos organismos e a expressão da variação em caracteres. Os efeitos ambientais têm sido detectados quando são observadas diferentes condições de forma influenciadas por taxas de mutação, recombinação, estabilidade no desenvolvimento de

organismos e na maneira como os genes interagem com o ambiente, produzindo fenótipos. Existem evidências de que o desenvolvimento de taxas de recombinação ocorre quando as populações são expostas a diferentes condições ambientais (HOFFMAN; PARSONS, 1997). Admiti-se que todo caráter fenotípico seja potencialmente dotado de plasticidade e que esta evolua em resposta à variabilidade temporal. Tal evolução baseia-se na relação entre as mudanças ambientais e as fenotípicas (FORATTINI, 1996).

Entre os fatores abióticos existentes, a temperatura é a que mais influencia a morfologia, pigmentação e distribuição dos organismos (HOFFMAN; PARSON, 1997; BERNARDO; PEDATA; VIGGIANI, 2007). Muitas espécies de insetos têm sido estudadas quanto à variação de forma e pigmentação do corpo, quando são expostas a diferentes temperaturas. Esses estudos têm sido mais desenvolvidos com as moscas da família Drosophilidae. A plasticidade fenotípica da forma e tamanho da asa de duas populações naturais de *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera: Drosophilidae) pertencentes às regiões equatoriais e subtropicais, foram estudadas para determinar a influência de diversas temperaturas (17°C a 31°C), na modificação desses caracteres morfológicos. Nas duas populações, foram observadas diferenças morfológicas significativas, especialmente em temperaturas mais baixas (LOH et al., 2008). O comprimento da asa e do tórax das espécies crípticas de *Drosophila melanogaster* (Meigen) e *D. simulans* (Sturtevant) provenientes de regiões tropicais e temperadas, foram analisadas quando expostas a diferentes regimes termais, sendo observado um aumento da asa com o aumento da temperatura (MORIN et al. 1999). Hatadani (2002) estudou a influência da temperatura nos padrões de manchas abdominais de duas populações de *D. mediopunctata* Dobzhansky & Pavan; verificou o efeito intenso desse fator abiótico em moscas criadas em temperaturas mais baixas, nas quais, os indivíduos, apresentavam mais manchas. Hatadani; Klaczko (2007) ainda analisaram o efeito da temperatura nas inversões cromossômicas do tamanho e forma da asa e também verificaram a influência da temperatura sobre os componentes morfológicos, indicando a existência da interação genótipo-ambiente para essa característica. Em *Drosophila*, vários trabalhos que tratam da plasticidade estão concentrados em caracteres morfológicos como tamanho ou forma da asa (NOACH; DE JONG; SCHARLOO, 1997; DE MOED; DE JONG; SCHARLOO, 1997; BITNER-MATHÉ; KLACKZO, 1999; HOFFMANN et al., 2005) e tamanho do tórax (THOMAS; BARKER, 1993; PARTRIDGE et al., 1994). Geralmente, existe um paralelismo

entre a variação genética e a plasticidade morfológica, que é considerado como sendo adaptativo (ATKINSON, 1994; GIBERT et al., 2004).

Em Hymenoptera, os parasitóides apresentam um grande número de grupos de espécies caracterizadas por apresentar altos níveis de especificidade hospedeira e baixos níveis de diferenciação morfológica (UNRUH; MESSING, 1993; POLASZEK; DESSART, 1996; CLARIDGE; DAWAH; WILSON, 1997). A variação cromática de várias famílias de Hymenoptera tem sido documentada (VIGGIANI, 1963; 1999; LAUDONIA; VIGGIANI, 1993; ZAVIEZO; MILLS, 1999). Em virtude da alta variabilidade de coloração e outras características morfológicas, *Pnigalio soemius* (Walker) (Hymenoptera: Eulophidae) apresenta limites de identificação pouco definidos. Ao ser analisado em diferentes temperaturas, foi verificada uma forte influência desse fator abiótico na pigmentação dos tergitos do gáster, além de outras partes do corpo, como tarsos tendendo ao escurecimento, quando expostos a temperaturas mais baixas. Alterações no comprimento da asa também foram observadas (BERNARDO; PEDATA; VIGGIANI, 2007). A distribuição geográfica afeta a cor dos espécimes, sendo encontrados indivíduos mais escuros em latitudes mais elevadas, onde as médias de temperatura são mais baixas (DE OLIVEIRA et al., 2004).

Outras fontes de variabilidade também são igualmente importantes para se analisar a ocorrência de plasticidade fenotípica entre os indivíduos, por exemplo, a forma dissimilar pode ser correlacionada com o tamanho e condições fisiológicas do hospedeiro (PINTO et al., 1989; SALVO; VALADARES, 1995). Por exemplo, em *Psytallya lounsburyi* (Silvestri) (Hymenoptera: Braconidae), o mesosoma e o metassoma são escuros nos indivíduos criados em *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae), no entanto, mudanças na coloração dessas regiões do corpo, na primeira geração, foram observadas, quando esses parasitóides foram criados em *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), havendo o desaparecimento de todas as manchas entre a terceira e sexta gerações (BILLAH et al., 2005). O efeito do hospedeiro também foi constatado em diversas populações de fêmeas de *Eubazus semirugosus* (Nees) (Hymenoptera: Braconidae) criadas em três espécies de curculionídeos, *Pissodes castaneus* De Geer, *P. pini* (L.) e *P. piniphilus* (Herbst). Foram observadas diferenças estatísticas significativas na modificação da forma de suas asas, que pode ser resultado do esforço induzido no desenvolvimento de um hospedeiro menos apropriado (VILLEMANT; SIMBOLOTTI; KENIS, 2007). O hospedeiro pode afetar a fisiologia do parasitóide e, conseqüentemente, afetar sua

morfologia (LAWRENCE; BARANOWSKI; GREANY, 1976; BILLAH et al., 2005). *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) apresentou diferenças no tamanho quando criado em diferentes hospedeiros, atingindo maior porte quando criado em *Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae) do que em *A. obliqua* (Macquart) (EBEN et al., 2000). As populações de insetos e de inúmeros grupos biológicos, frequentemente apresentam variações genótípicas e fenotípicas correlacionadas às regiões geográficas, fato que tem sido atribuído a diversas causas como a deriva genética e a seleção natural, que por muitas vezes, são influenciadas por fatores ambientais (FUTUYMA, 1992).

2.6 Importância dos braconídeos parasitóides de moscas-das-frutas

Nas últimas duas décadas, o uso de parasitóides pertencentes à família Braconidae (Hymenoptera) tem sido intensificado em diversos países da América, onde a produção e comercialização de frutos são afetadas pela presença de tefritídeos-pragas (OVRUSKI et al., 2000; GONZÁLEZ et al., 2007). Em vários países, por exemplo, Costa Rica, Guatemala, México e EUA (Flórida e Havaí), há programas de liberação de himenópteros parasitóides em áreas com altas infestações com moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) de importância quarentenária, como *Ceratitis capitata* (Wiedemann), *Anastrepha suspensa* (Loew), *A. obliqua* (Macquart) e *A. ludens* (Loew) (PURCELL, 1998; CANCINO; MONTOYA, 2004a). O controle biológico tem sido recentemente incorporado como uma alternativa válida dentro dos programas de manejo integrado dessas pragas (OVRUSKI et al., 2000; WALDER, 2002; CARVALHO; NASCIMENTO, 2002; PARANHOS, 2007; MALAVASI et al., 2007; PARANHOS et al., 2007).

O crescente reconhecimento do controle biológico de moscas-das-frutas está relacionado a três eventos: (1) melhoria das técnicas de criação massal de parasitóides exóticos e nativos em razão do desenvolvimento de novas estratégias de controle, que envolvem liberações inundativas do inimigo natural; (2) rejeição em todo o mundo da utilização de produtos químicos, nos pomares frutícolas, devido aos efeitos negativos ao ambiente e à saúde humana e (3) movimento para a conservação da biodiversidade nos ecossistemas agrários, com a utilização de táticas ecologicamente aceitáveis em combinação com a manipulação do habitat e o emprego de inimigos naturais (ALUJA, 1996, 1999; OVRUSKI et al., 2000). Entre o leque de parasitóides que atacam ovos, larvas e pupas de tefritídeos, os parasitóides pertencentes à família Braconidae,

especificamente os da subfamília Opiinae, destacam-se pela especificidade no parasitismo de tefritídeos. Esses braconídeos são endoparasitóides cenobiontes de larvas/pupas de dípteros ciclórrafos, cujos ovos são colocados nas larvas das moscas-das-frutas (Tephritidae) e os adultos emergem dos pupários dos hospedeiros.

Na região Neotropical, 41 espécies de opiíneos estão relacionadas com o parasitismo de larvas de espécies de *Anastrepha* (WHARTON; MARSH, 1978). Para as espécies de *Dacus* e *Ceratitis*, 43 espécies de opiíneos são utilizadas no controle biológico (WHARTON; GILSTRAP, 1983). No Brasil o maior número de espécies que parasitam larvas frugívoras pertence à família Braconidae (WHARTON, 1989). São conhecidos no Brasil cinco gêneros e 13 espécies de parasitóides de *Anastrepha* spp. *Asobara anastrephae* Muesebeck, *Asobara* sp., *Doryctobracon areolatus* Szépligeti, *D. fluminensis* Costa Lima, *D. brasiliensis* Szépligeti, *Doryctobracon* sp., *Microcrasis lonchaeae*, *Opius bellus*, *Opius* sp. aff. *bellus*, *O. bucki* Costa Lima, *Opius itatiayensis* Costa Lima, *O. tomoplagiae* Costa Lima, *Utetes anastrephae* Viereck (CANAL; ZUCCHI, 2000). Atualmente, *O. tomoplagiae* e *O. itatiayensis* estão incluídas no gênero *Utetes*, sendo nomeadas, portanto, *Utetes tomoplagiae* (Costa Lima, 1937) e *U. itatiayensis* (Costa Lima, 1937), por não compartilhar as características do gênero *Opius* (WHARTON, 1997b). Recentemente, foi documentado o primeiro registro para *Asobara obliqua* (Papp) (Alysiinae), coletado em área nativa no município de Janaúba, MG, em frutos de juá (*Ziziphus joazeiro*), parasitando larvas de *Neosilba* spp. (Diptera: Lochaedidae) (SOUZA et al., 2007).

Diachasmimorpha longicaudata (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) tem sido a espécie mais utilizada em todo o mundo, em liberações massivas para controlar moscas-das-frutas (SIVINSKI, 1996; OVRUSKI et al., 2000; CANCINO; MONTOYA, 2004b). Essa espécie é amplamente utilizada em programas de liberação massiva ou associada a programas de manejo integrado em fruticultura por diversos fatores: facilidade de criação massal em laboratório, rápida adaptação aos ambientes onde é liberada e especificidade no parasitismo de tefritídeos (MONTOYA et al., 2000). *D. longicaudata* está adaptada a diferentes espécies de moscas-das-frutas de importância econômica, como *A. fraterculus*, *A. suspensa* (Loew), *A. ludens* (Loew), *A. obliqua* (Macquart), *A. striata* Schiner, *A. serpentina* (Wiedemann) e *C. capitata* (Wiedemann) (MONTOYA et al., 2000; OVRUSKI et al., 2000; CARVALHO; NASCIMENTO, 2002; SCHLISERMAN; OVRUSKI; DECOLL, 2003). É originária da região indo-pacífica e tem sido amplamente disseminada pela América e no Havaí, e pode ser considerada estabelecida com

sucesso na maioria dos países no qual foi introduzida, como Colômbia, Costa Rica, Guatemala, El Salvador, México, Nicarágua, Trinidad, EUA (Florida), Venezuela (OVRUSKI et al., 2000) e Brasil (CARVALHO; NASCIMENTO, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de parasitóides de moscas-das-frutas

Amostras de diversas populações de parasitóides de moscas-das-frutas (Braconidae: Opiinae) foram solicitadas às instituições e pesquisadores de diferentes regiões do Brasil, para obter diversidade de material para os estudos morfométricos e moleculares. As populações de braconídeos, recebidas de várias localidades, foram coletadas seguindo a metodologia tradicional para obtenção de moscas-das-frutas e parasitóides (e.g. Leonel Jr. et al., 1996) e fixados em álcool 70%. Os espécimes de cada amostra foram identificados, parte foi acondicionada em etanol 100%, armazenados a temperatura de -80°C para extração do DNA e a maioria foi mantido em etanol 70% para o desenvolvimento de estudos morfométricos.

3.2 Identificação taxonômica de parasitóides de moscas-das-frutas

As identificações foram baseadas na posição das mandíbulas, esculturação do propódeo e nervação alar utilizando chaves de identificação específicas (WHARTON, 1997a; SOUZA FILHO, 1999; MARINHO, 2004) e pela comparação com espécimes depositados na coleção da ESALQ (Entomologia).

Neste trabalho, foram estudados *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911), *Doryctobracon* sp. 1 (estigma claro), *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro), *Opius bellus* Gahan, 1930 e *Opius* sp. aff. *bellus*. O estudo foi baseado nesses espécimes em razão dos problemas de identificação de *Opius* sp. aff. *bellus* e de *Doryctobracon* sp. 2, os quais persistem desde 1991 e 1997 respectivamente (LEONEL JÚNIOR, 1991; VELOSO, 1997). As populações de *O. bellus* e *Opius* sp. aff. *bellus* foram selecionadas com base na variabilidade da coloração nas tíbias posteriores e ápice das antenas. Essa variabilidade morfológica foi levada em consideração para determinar a proximidade genética entre os morfotipos investigados. Assim, indivíduos com tíbia clara/antena clara (A); tíbia clara/antena escura (B); tíbia escura/antena clara (C) e tíbia escura/antena escura (D), foram selecionados e submetidos à análise molecular, por meio do uso dos marcadores ITS2 e 28S rDNA D2.

3.3 Ilustrações

Os braconídeos foram montados em bases apropriadas de alumínio (*stubs*) por meio de fita adesiva de dupla face. Estas amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro no metalizador utilizado como *sputter coater* e, assim, examinadas ao microscópio eletrônico de varredura (Zeiss – DSM 940A e LEO 435VP) pertencente ao Núcleo de Apoio à Pesquisa, Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) – ESALQ/USP. As asas anteriores foram retiradas dos exemplares, distendidas em lâmina de microscopia e cobertas com etanol 70% e lamínula. As imagens foram realizadas em câmera digital acoplada a microscópio estereoscópico.

3.4 Estudos morfométricos

3.4.1 Espécies de braconídeos selecionados para o estudo morfométrico

A morfometria geométrica foi realizada para *Doryctobracon areolatus* de 11 estados (Rio Grande do Norte, Bahia, Ceará, Amazonas, Amapá, Tocantins, Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Santa Catarina), *Doryctobracon* sp.1 (estigma claro) (Amapá), *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro) (Goiás e Amapá) e para *Opius bellus* e *Opius* sp., ambas provenientes do Amazonas, Amapá e Rio Grande do Norte (Figura 1).

3.4.2 Coleta de dados morfométricos

Foram selecionados de cada amostra, quando possível, 40 braconídeos (20 machos e 20 fêmeas), para tomada de medidas das asas, para comparar o tamanho e a forma, utilizando-se a morfometria geométrica. A asa anterior (esquerda) dos braconídeos foi retirada e distendida individualmente em lâmina de vidro milimetrada; as imagens foram adquiridas e digitalizadas por meio de câmera acoplada a microscópio estereoscópico (programa Motic). Na sequência, com o auxílio do “*software*” TpsUtil versão 1.38 (ROHLF, 2006), foi construído um arquivo

que permitisse a análise das imagens previamente capturadas. Posteriormente, os 20 marcos anatômicos homólogos para as espécies de *Doryctobracon* e *Opius* foram digitalizados utilizando-se o “software” TpsDig versão 1.40 (ROHLF, 2004), que permite digitalizar os marcos transformando-os em coordenadas cartesianas (x e y). A descrição dos marcos anatômicos (pontos homólogos), e das nervuras e setores da asa anterior da família Braconidae estão especificados nas Figuras 2 a 4.

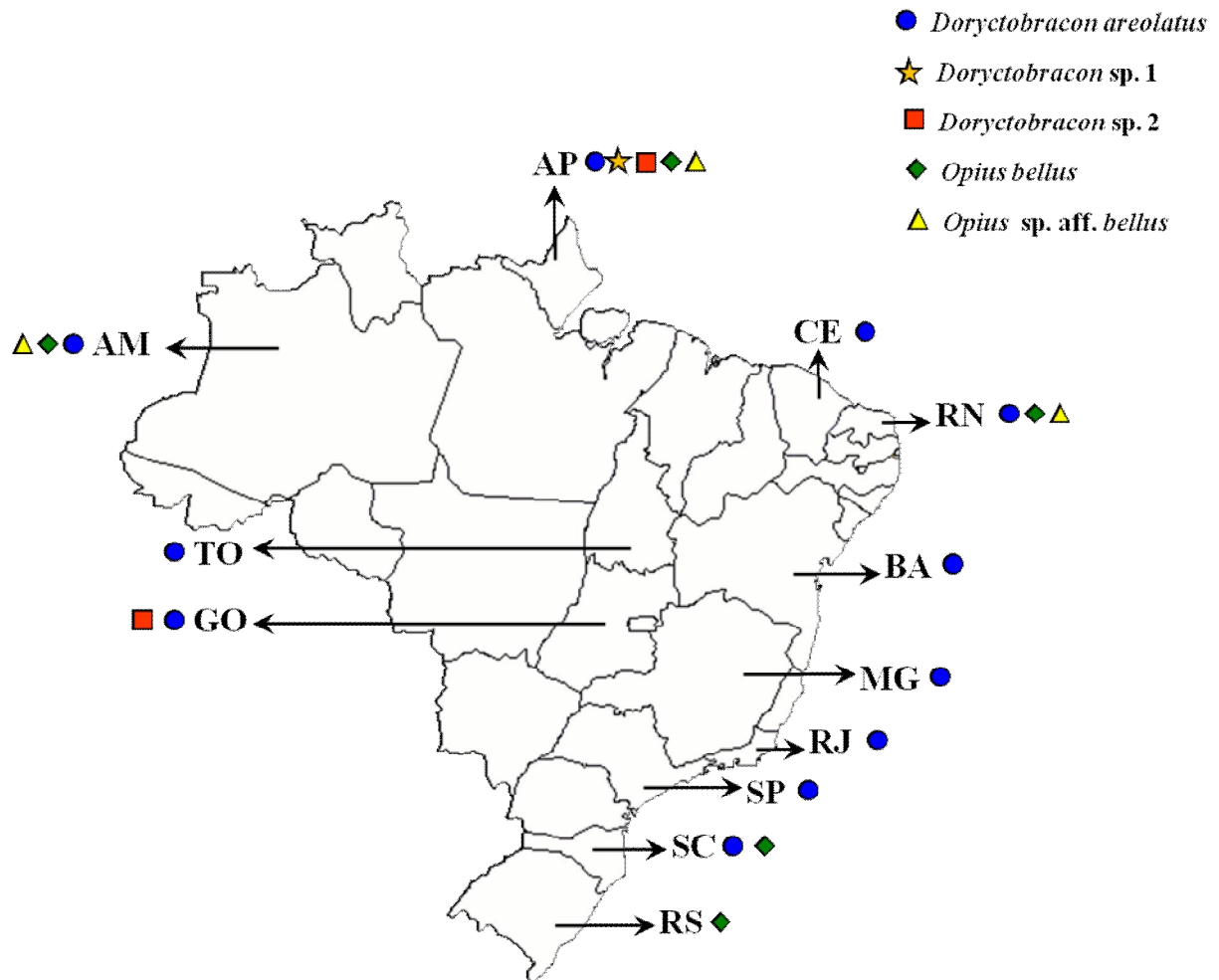
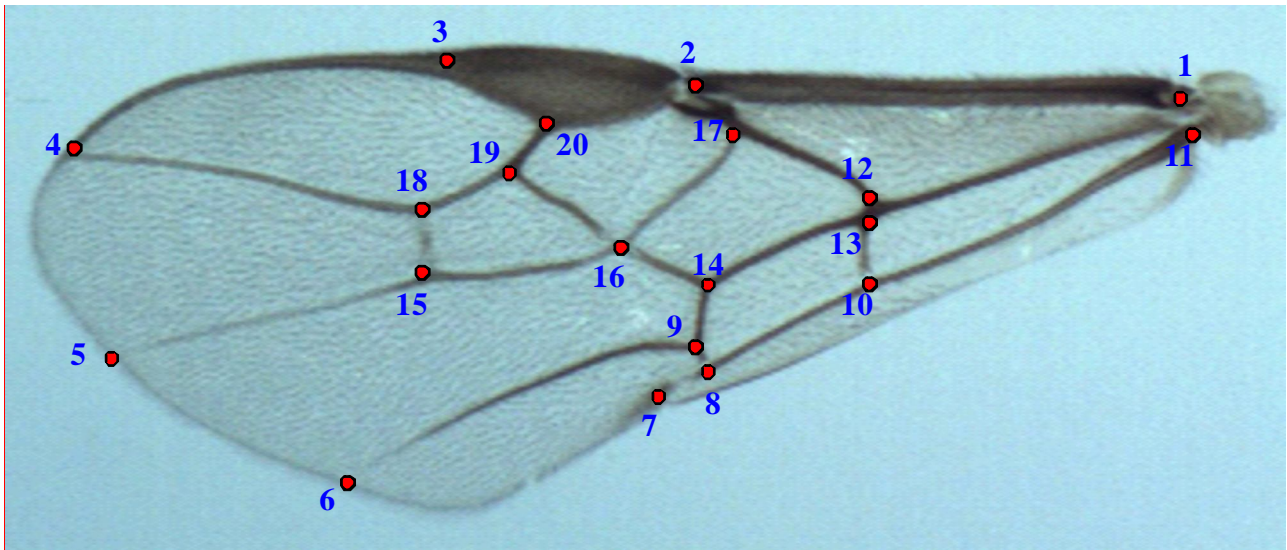
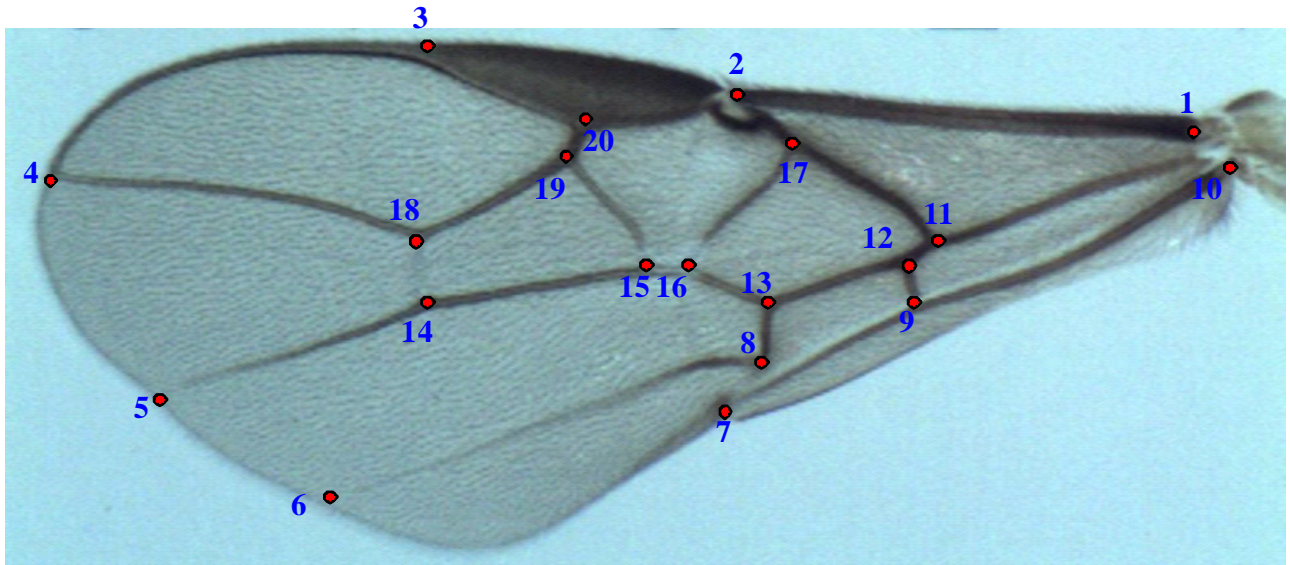


Figura 1 - Locais das amostras dos braconídeos



LANDMARKS	DESCRIÇÃO	TIPO
1	Intersecção das nervuras costal, subcostal e radial (C+SC+R) e borda da asa	I
2	Intersecção do parastigma, 1RS e borda da asa	I
3	Intersecção do final do estigma e R1a	I
4	Intersecção da nervura setor radial 3RSb e borda da asa	I
5	Intersecção da nervura medial 3M e borda da asa	I
6	Intersecção da nervura cubital 3CU e borda da asa	I
7	Intersecção da nervura anal 3-1A e borda da asa	I
8	Intersecção das nervuras 3-1A e 2cu-a	I
9	Intersecção das nervuras 2CUa e 3CU e 2cu-a	I
10	Intersecção das nervuras 1-1A, 1cu-a e 2-1A	I
11	Intersecção das nervuras 1-1A e base da asa	I
12	Intersecção das nervuras M+CU, 1M e 1CU	I
13	Intersecção das nervuras M+CU, 1cu-a e 1CU	I
14	Intersecção das nervuras 2CUa, 1CU e 1m-cu	I
15	Intersecção das nervuras 2M, r-m e 3M	I
16	Intersecção das nervuras 1m-cu, (RS+M)a, 2RS e 2M	I
17	Intersecção das nervuras 1M, (RS+M)a e 1RS	I
18	Intersecção das nervuras 3RSa, 3RSb e r-m	I
19	Intersecção das nervuras 3RSa, r e 2RS	I
20	Intersecção da nervura r e base do estigma	I

Figura 2 - Marcos anatômicos e descrição das nervuras da asa anterior de *Doryctobracon areolatus*



LANDMARKS	DESCRIÇÃO	TIPO
1	Intersecção das nervuras costal, subcostal e radial (C+SC+R) e borda da asa	I
2	Intersecção do parastigma, 1RS e borda da asa	I
3	Intersecção do final do estigma e R1a	I
4	Intersecção da nervura setor radial 3RSb e borda da asa	I
5	Intersecção da nervura medial 3M e borda da asa	I
6	Intersecção da nervura cubital 3CU e borda da asa	I
7	Intersecção da nervura anal 3-1A e borda da asa	I
8	Intersecção das nervuras 2CUa e 3CU	I
9	Intersecção das nervuras 1-1A, 1cu-a e 2-1A	I
10	Intersecção das nervuras 1-1A e base da asa	I
11	Intersecção das nervuras M+CU, 1M e 1CU	I
12	Intersecção das nervuras M+CU, 1cu-a e 1CU	I
13	Intersecção das nervuras 2CUa, 1CU e 1m-cu	I
14	Intersecção das nervuras 2M, r-m e 3M	I
15	Intersecção das nervuras (RS+M)b, 2RS e 2M	I
16	Intersecção das nervuras (RS+M)a, (RS+M)b e 1m-cu	I
17	Intersecção das nervuras 1M, (RS+M)a e 1RS	I
18	Intersecção das nervuras 3RSa, 3RSb e r-m	I
19	Intersecção das nervuras 3RSa, r e 2RS	I
20	Intersecção da nervura r e base do estigma	I

Figura 3 - Marcos anatômicos e descrição das nervuras da asa anterior de *Opius bellus*

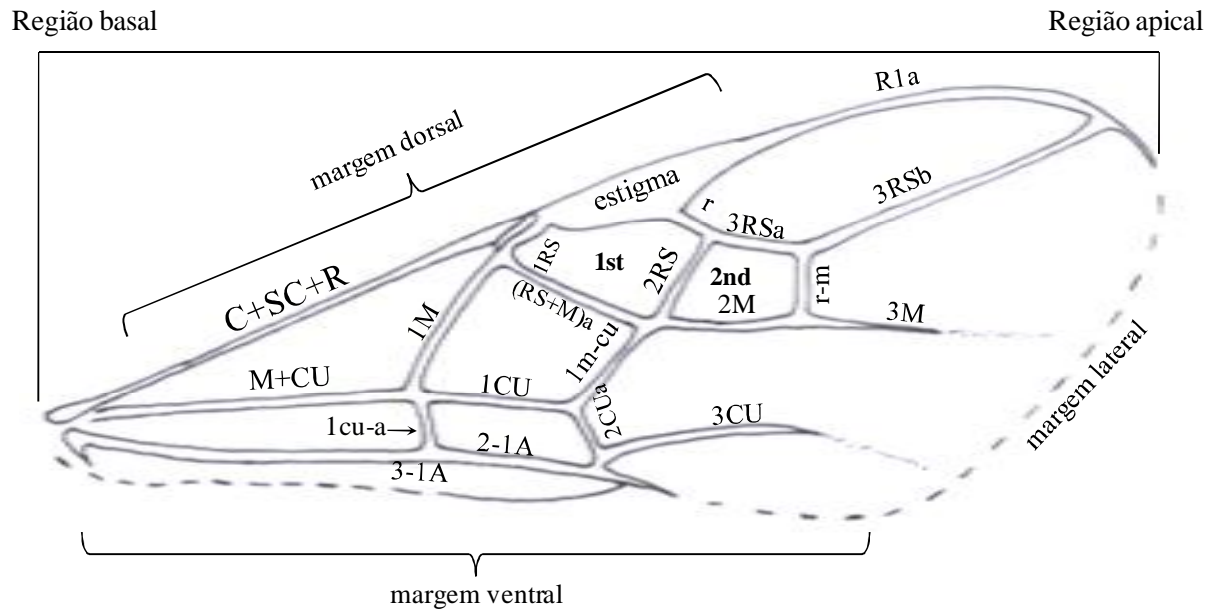


Figura 4 - Descrição das nervuras e setores da asa anterior da família Braconidae, baseado em (SHARKEY; WHARTON, 1997)

3.4.3 Análise dos dados morfométricos

A partir dos 20 marcos anatômicos foram geradas 36 medidas de deformações relativas ($k = 2n-4$), sendo k representado pelo número total de deformações relativas, e n o número de marcos anatômicos determinados. Por meio do programa TpsRewl versão 1.45 (ROHLF, 2007), as configurações dos marcos anatômicos foram sobrepostas pelos métodos dos quadrados mínimos, este método transforma uma configuração de marcos, superpondo-a em uma configuração de referência (consenso), transladando, normalizando e rotacionando de modo que a soma do quadrado das distâncias seja a menor possível (MONTEIRO; REIS, 1999). Os consensos são os conjuntos de valores posicionais médios dos 20 pontos anatômicos amostrados para cada população estudada e são representados simultaneamente sob a forma de “asa consenso”, que na verdade é a conformação alar média de cada população. Os escores das médias populacionais das variáveis canônicas, computadas a partir das variáveis de forma, foram projetadas no espaço entre as variáveis canônicas em gráficos de dispersão que permitem visualizar a ordenação das populações em relação às variações de forma das asas analisadas,

sendo os gráficos construídos pelo programa STATISTICA 7.0. Os diagramas de deformação foram obtidos a partir da regressão da variável canônica sobre os componentes de forma, utilizando-se o software TpsRegr 1.33 (ROHLF, 2007). Foram aplicados os testes Wilks' Lambda ($P < 0,0001$), Pillai's Trace ($P < 0,0001$), Hotelling-Lawley Trace ($P < 0,0001$) e Roy's Greatest Root ($P < 0,0001$) para verificar a significância nos dados, utilizando-se o SAS system (1990). O tamanho do centróide foi utilizado nas comparações entre os sexos, dentro de cada amostra populacional utilizando-se o programa STATISTICA 7.0. O centróide constitui um ponto imaginário, que representa o centro geométrico da asa, determinado pela média dos valores posicionais no plano cartesiano de todos os pontos anatômicos da asa; representa o centro de massa de uma configuração, fundamental para a definição de tamanho. Assim, o tamanho da asa é representado em termos de tamanho do centróide. Com base no valor do tamanho de centróide calculado a partir das asas, construiu-se a tabelas de médias e desvios-padrão para determinação do tamanho dessa estrutura (MONTEIRO; REIS, 1999). O grau de similaridade das populações foi estimado mediante o cálculo das distâncias de Mahalanobis entre seus centróides, sendo organizado na forma de tabelas e convertido em fenogramas, construídos conforme o algoritmo UPGMA pelo programa STATISTICA 7.0. A distância de Mahalanobis é uma distância linear, semelhante à distância Euclidiana, porém medida entre pontos no espaço multidimensional. Todos os programas de morfometria estão disponíveis *free* pelo site (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>).

3.5 Análises moleculares

3.5.1 Preparo do material

Após serem identificados, os braconídeos foram submetidos à extração de DNA. Foram utilizados os abdômes de fêmeas e machos, já que apenas as asas e o propódeo são os caracteres utilizados na identificação desses insetos. Os demais segmentos (cabeça, tórax inclusive asas) foram acondicionados em tubo contendo etanol 70%, para posterior análise taxonômica, sendo os mesmos depositados na coleção de Entomologia do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP.

3.5.2 Extração do DNA

A extração do DNA genômico de cada exemplar seguiu o protocolo de extração salina (ALJANABI; MARTINEZ, 1997). As extrações foram realizadas individualmente, utilizando-se o abdome de cada espécime. Uma vez no tubo, 400µl da solução de homogeneização tris-EDTA-cloreto de sódio (TEN) (10mM Tris-HCl pH 8.0; 2mM EDTA pH 8.0; 0,4M NaCl), acrescida de 40µl SDS a 20% e 8µl de proteinase-K 20mg/ml, foi utilizada para a maceração do material com auxílio de pistilo. Na sequência, a amostra foi homogeneizada e incubada em banho-maria a 55°C por 1h. Após este período, foram adicionados 300µl de solução aquosa saturada de cloreto de sódio (6M NaCl), a amostra foi agitada vigorosamente em vórtex (30s) e centrifugada (14,000g x 25 min a 25°C). O sobrenadante foi transferido para novo microtubo e o DNA precipitado após adição de um volume de etanol 100% gelado e incubação a -20°C por 1h. O material foi então centrifugado (14,000g x 20 min a 4°C), o sobrenadante descartado e o pellet de DNA lavado em banhos sucessivos de etanol 100% (1x) e 70% (2x). Um mililitro de etanol foi adicionado ao tubo, sendo o pellet lavado pela inversão do tubo (5 a 6 vezes), seguida de centrifugação a 14,000g por 10 min a 4°C. Ao término das lavagens, o pellet de DNA foi seco a temperatura ambiente por 15 a 20 min e o DNA obtido ressuspensão em 20µl de água Milli-Q autoclavada e armazenado a -20°C até sua utilização. A integridade do DNA extraído foi avaliada em gel de agarose 0,8%, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio, em tampão tris-acetato-EDTA (TAE) a 5V/cm, visualizada em transluminador.

3.5.3 Amplificação da região do ITS2 rDNA e segmento de expansão D2 do 28S rDNA

As amostras extraídas dos espécimes foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação da região espaçadora do genoma nuclear “Internal Transcribed Spacer” (ITS2) do rDNA, e do segmento de expansão (D2) da estrutura secundária 28S do rDNA. Para a amplificação dessas porções foram utilizados os iniciadores: 5.8S (5’GTGAATTCTGTGA ACT GCAGGACACATGAAC3’) e 28S (5’ ATGCTTAAATTTAGGGGGTA3’) para o ITS2, e F3665 (5’AGAGAGAGTTCAAGAGTACGTG3’), R4047 (3’TTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG5’)

para o 28SD2, os quais amplificam fragmentos dentro da região proposta para a identificação de espécies (Figura 5).

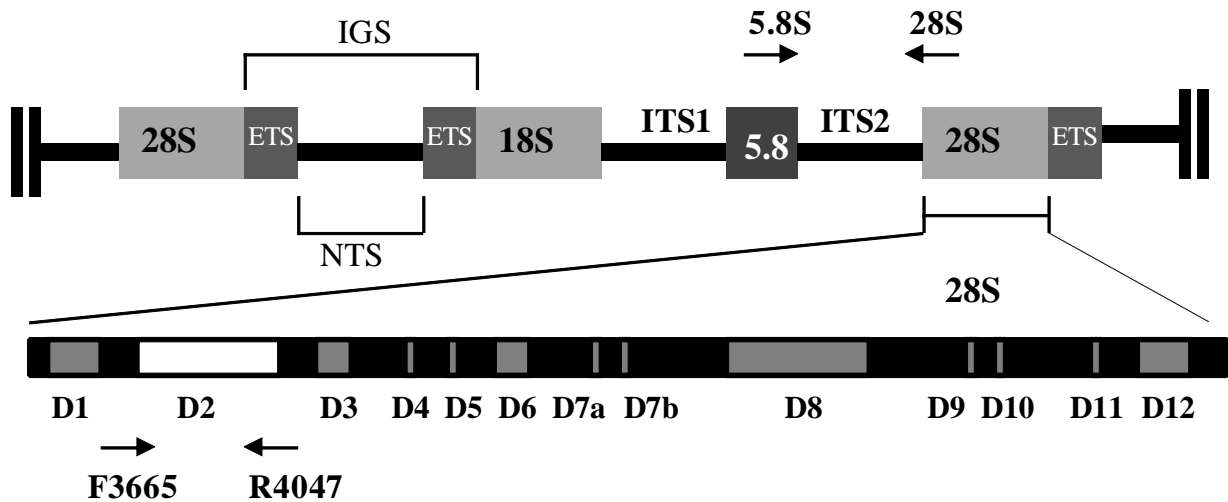


Figura 5 - Esquema da unidade de repetição do rDNA, com as seguintes regiões, ETS – espaçador externo; ITS – espaçador interno; 28S – região que codifica para 28S rDNA, com detalhe dos segmentos presentes nesta região, inclusive com D2 utilizado; NTS – espaçador não transcrito; 18S – região que codifica para 18S rDNA; 5.8S – região que codifica para o 5.8S; IGS – espaçador intergênico (Figura adaptada de Melen et al., 1999)

As reações de amplificação dos fragmentos ITS2 e D2 do 28S rDNA para as populações de *Doryctobracon areolatus*, *Doryctobracon* sp. 1, *Doryctobracon* sp. 2, *Opius bellus* e *Opius* sp. foram conduzidas em volume total de 25µl, composta por 1,0 µl de gDNA 5µl de 5x PCR buffer, 1,5mM MgCl₂, 200µM dNTP/cada, 0,4µl a 0,32µM de cada iniciador, 0,25 unidade de Taq polimerase (PROMEGA). Foram realizadas reações em termociclador BioRad programado a 94°C por 2 min; 35 ciclos a 94°C por 30 s, 49°C por 30 s, 72°C por 1 min; 72°C por 20 min para ITS2, e 93°C por 3 min; 35 ciclos a 98°C por 15s, 48°C por 30s, 72°C por 40s; 72°C por 3min, para o 28S rDNA D2. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose a 1,5%, contendo 0,5µg/ml de brometo de etídio para a coloração dos fragmentos de DNA, em tampão tris-acetato-EDTA (TAE) a 5V/cm. A visualização do gel foi feita em transluminador (UV) e a aquisição das imagens em sistema digitalizador. Todos os produtos de PCR foram purificados com QIAquick PCR Purification Kit da Quiagen®, seguindo as especificações do fabricante.

3.5.4 Clonagem e sequenciamento

Os produtos de PCR para o gene ITS2 dos espécimes das populações de *Doryctobracon* sp. 1, *Doryctobracon* sp. 2, *Opius bellus* e *Opius* sp. foram inseridos em sistema pGEN-T Easy Vector System I (PROMEGA) e clonados em células competentes de *Escherichia coli* C2992 NEB5-APHA-F' (BIOLABS), seguindo as recomendações do fabricante. Para o segmento de expansão D2 do 28S do rDNA, realizou-se sequenciamento direto.

Após a inserção dos fragmentos amplificados em células *E. coli* competentes (BIOLABS), as bactérias foram cultivadas em meio SOC Medium (37°C x 1h) sob agitação constante, sendo posteriormente plaqueadas em LB-agar contendo 20mg/ml do antibiótico ampicilina e incubadas a 37°C, por 16 h. Colônias positivas foram selecionadas e cultivadas por 16h em meio LB líquido acrescido de antibióticos. Após o cultivo, as células foram sedimentadas por centrifugação por 1 min a 12000g a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 110µl de solução de ressuspensão (50mM Tris-HCl, pH7.5; 10mM EDTA; 100µg/ml RNase A) e 10µl de RNase. A seguir foram adicionados 100µl de tampão de lise novo (50µl 400mM NaOH, 50µl SDS 2%), gentilmente agitado por inversão, e 120µl de tampão neutralizador (5M acetato de potássio, pH 5,5). O tubo foi novamente agitado por inversão e incubado por 3 min à temperatura ambiente. Os restos celulares foram removidos por centrifugação por 2 min a 12000 rpm e o sobrenadante transferido para novo microtubo. Na sequencia, 200µl de isopropanol gelado foram adicionados para precipitação do DNA plasmidial, sendo incubado por 1 min a temperatura ambiente. O DNA foi então centrifugado a 14000 rpm por 1 min e o sobrenadante descartado. Após a centrifugação, foram adicionados 500µl de etanol 70%, sendo novamente centrifugado a 14000g por 1 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em etanol a 70%, sendo ressuspense em água Milli-Q autoclavada e armazenado a -20°C até sua utilização.

Os insertos dos diferentes transformantes foram sequenciados pelo Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH-USP) (<http://genoma.ib.usp.br/servicos/sequenciamento.php>), de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) e iniciadores universais T7 e SP6. As reações de sequenciamento foram bidirecionais apenas para o marcador ITS2.

Todas as sequências obtidas foram analisadas pelo programa BioEdit Software *free* (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>) para comparação das fitas e eliminação de erros de leitura do sequenciamento.

3.5.5 Alinhamento e análises das sequências

As sequências amplificadas para o ITS2 e 28S rDNA D2 entre as populações de *D. areolatus*, *Doryctobracon* sp. 1, *Doryctobracon* sp. 2, *O. bellus* e *Opius* sp. foram alinhadas inicialmente pelo programa Clustal W. Em seguida, para verificar a divergência destes marcadores entre diferentes populações desses espécimes, pertencente a outras localidades foi realizada uma busca para obtenção de sequências amplificadas com estes marcadores no banco mundial de dados genéticos National Center for Bioinformatics (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências amplificadas para o 28S rDNA D2 entre as populações de *D. areolatus*, *Doryctobracon* sp. 1, *Doryctobracon* sp. 2, *O. bellus* e *Opius* sp. foram alinhadas com as sequências de diferentes espécies pertencentes ao gênero, *Opius basirufus* Fischer (número de acesso Z93649.1), *O. bellus* Gahan (Z93650.1), *O. cingulatus* Wesmael (Z93651.1), *O. dissitus* Muesebeck (Z93652.1), *O. exiguus* Wesmael (Z93653.1), *O. fuscipennis* Wesmael (Z93654.1), *O. spetrus* Haliday (Z93655.1), enquanto os demais espécimes de *D. areolatus*, *Doryctobracon* sp. 1. e *Doryctobracon* sp. 2 foram alinhados com *Doryctobracon crawfordi* Viereck (Z93646.1). Para o marcador ITS2 não haviam sequências depositadas entre as espécies estudadas no banco de dados (NCBI).

As sequências foram alinhadas utilizando-se da ferramenta ClustalW, com penalidade por intervalo aberto (“gap open penalty”) igual a 13,0 e penalidade pela extensão do intervalo (“gap extension penalty”) igual a 7,6. Para a reconstrução das árvores filogenéticas para os insetos estudados foi utilizado o método da distância, sendo as distâncias estimadas pelo método de Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993), não havendo necessidade de correção para as taxas de desigualdade no número e tipo de transições e transversões. As sequências alinhadas foram avaliadas pelo método de Neighbour Joining (NJ) para a construção das árvores filogenéticas, com 1000 repetições para as análises de *bootstrap*. Todas as análises foram conduzidas utilizando-se do pacote estatístico MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amostras de *Doryctobracon areolatus*, *Doryctobracon* sp. 1, *Doryctobracon* sp. 2, *Opius bellus* e *Opius* sp. foram obtidas de diversas regiões brasileiras, em diferentes fruteiras (Tabela 1). Não foi possível fazer a associação do parasitóide com a espécie de mosca hospedeira, uma vez que os parasitóides foram obtidos em levantamentos de moscas-das-frutas por vários pesquisadores, sem o objetivo de fazer a associação parasitóide/mosca. As plantas associadas para *D. areolatus* dos estados RN, CE, BA, AM, RJ e MG foram omitidas, por terem sido utilizadas diversas amostras.

Tabela 1 - Espécies de braconídeos, plantas hospedeiras de moscas-das-frutas e localidades

BRACONIDAE	PLANTAS HOSPEDEIRAS	LOCALIDADES
<i>Opius bellus</i>	Taperebá	Manaus – AM
<i>Opius</i> sp.	(<i>Spondias mombin</i> L)	
<i>O. bellus</i>	Araçá vermelho	Santa Catarina - SC
<i>Opius</i> sp.	(<i>Psidium cattleianum</i>)	
<i>O. bellus</i>	Araçá amarelo	Rio Grande do Sul - RS
	(<i>Psidium cattleianum</i>)	
<i>O. bellus</i>	?	Rio Grande do Norte - RN
<i>Opius</i> sp.		
<i>O. bellus</i>	Café	Rio de Janeiro - RJ
<i>Opius</i> sp.	(<i>coffea arabica</i>)	
<i>O. bellus</i>	Siriguela	Tocantins - TO
	(<i>Spondias purpurea</i> L)	
<i>Doryctobracon areolatus</i>	Siriguela	Goiás - GO
	(<i>Spondias purpurea</i> L)	
<i>Doryctobracon</i> sp. 2	Bacupari	
	(<i>Garcinia gardneriana</i>)	
<i>D. areolatus</i>	Siriguela	São Paulo - SP
	(<i>Spondias purpurea</i> L)	
<i>D. areolatus</i>	Taperebá	
	(<i>Spondias mombin</i> L)	Amapá - AP
<i>Doryctobracon</i> sp. 1	Quina	
<i>Doryctobracon</i> sp. 2	(<i>Geissospermum argenteum</i>)	
<i>D. areolatus</i>	Jambo da mata	Tocantins - TO
<i>Doryctobracon</i> sp. 2	(<i>Isertia hypoleuca</i> Benth).	

4.1 Caracterização morfológica de *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti) e de duas espécies relacionadas

Doryctobracon areolatus (Szépligeti) morfológicamente, diferencia das demais espécies de Opiinae pelo clípeo com a margem apical ligeiramente sinuosa e pelo espaço entre o clípeo e as mandíbulas, quando fechadas (Figura 6A e 6B). O mesoescuto é brilhante com notáulices completas e não crenuladas e sulco pré-escutelar com uma carena, médio-transversal (Figura 6C); Propódeo coberto por pêlos e com distinta e curta carena médio-anterior areolado posteriormente (Figura 6D); mesopleura lisa (Figura 6E). Asa anterior com nervura 3RS igual ou menor do que a 2RS, nervura m-cu diretamente em linha com a 2RS (Figura 6G); asa posterior com m-cu. Apresenta, em geral, coloração vermelho-amarelada, com asas hialinas (Figura 9A) (WHARTON, 1997b).

Os exemplares das duas espécies não identificadas de *Doryctobracon* obtidos em levantamentos no Amapá (*Doryctobracon* sp. 1) e em Goiás e Tocantins (*Doryctobracon* sp. 2) apresentam semelhanças morfológicas com *D. areolatus*. Cabeça com clípeo sinuoso com espaço entre clípeo e mandíbulas (Figuras 7B e 8B), mesoescuto com notáulices completas e não crenuladas, sulco pré-escutelar com uma carena médio-transversal (Figuras 7C e 8C), mesopleura lisa (Figuras 7F e 8E) e propódeo com uma distinta e curta carena médio-anterior e areolado posteriormente (Figuras 7D e 8D). Propódeo piloso (pilosidade mais pronunciada em *Doryctobracon* sp. 1) (Figura 7D). Asa anterior esfumada, com disposição das nervuras semelhantes à de *D. areolatus* (nervura 3RS igual ou menor a 2RS, nervura m-cu diretamente em linha com a 2RS) (Figura 7G e 8G); asa posterior com m-cu. No entanto, *Doryctobracon* sp. 1 e *Doryctobracon* sp. 2 diferenciam-se pela presença de uma faixa hialina na asa anterior, próxima ao ápice. Em *Doryctobracon* sp. 1, a faixa é larga, alcança a base da asa, estigma amarelado (Figuras 7G e 9B). Em *Doryctobracon* sp. 2, a faixa é mais estreita, estigma escurecido, nesse caso, a faixa termina antes da base da asa (Figuras 8G, 9C a 9E). Em *Doryctobracon* sp. 2, coxas, fêmur, tíbia e tarsos posteriores podem apresentar padrão de escurecimento variável em toda a perna ou apenas parcialmente (por segmento) (Figuras 9C a 9E). Há aproximadamente uma década, foram coletados os primeiros exemplares de *Doryctobracon* sp. 2 (VELOSO, 1997), mas até hoje a identidade desses exemplares não foi esclarecida. *Doryctobracon* sp. 2 está sendo reportado pela primeira vez neste estudo.

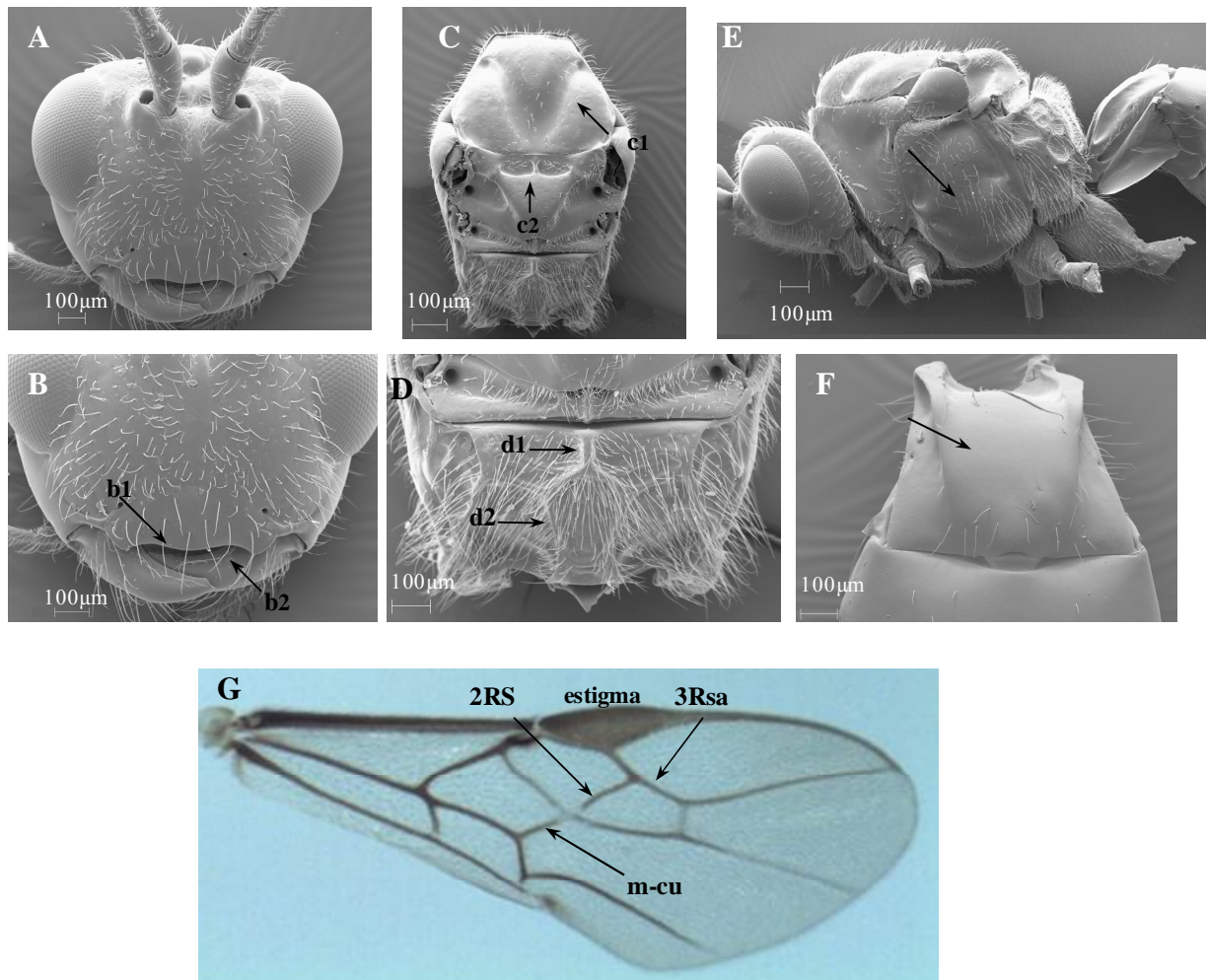


Figura 6 – *Doryctobracon areolatus*. A. Cabeça, vista frontal (170x); B. Cabeça vista parcial (b1. Clípeo; b2. espaço entre clípeo e mandíbulas) (272X); C. Mesossoma, vista dorsal (c1. notáulices completas e não crenuladas; c2. sulco pré-escutelar com uma carena mediana transversal (105x); D. Propódeo (d1. Carena médio-anterior curta; d2 aréola) (263x); E. Cabeça e mesossoma, mesopleura lisa (seta), vista lateral (87x); F. Base do gáster (seta), vista dorsal (263x); G. Asa anterior

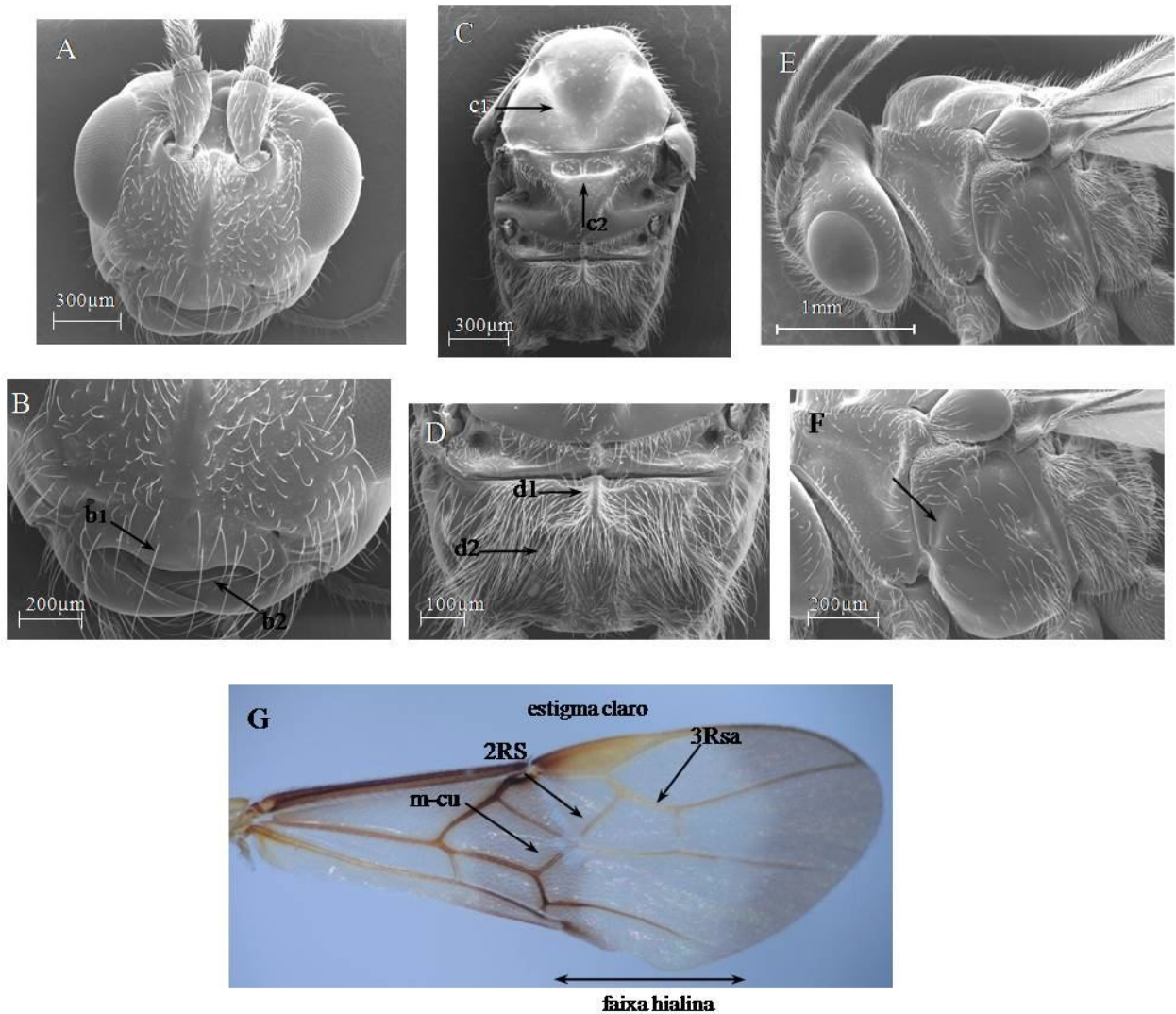


Figura 7 – *Doryctobracon* sp. 1. A. Cabeça, vista frontal (59x); B. Cabeça vista parcial (b1. Clípeo; b2. espaço entre clípeo e mandíbulas) (131x); C. Mesossoma, vista dorsal (c1. notáulices completas e não crenuladas; c2. sulco pré-escutelar com uma carena mediana transversal (38x); D. Propódeo (d1. Carena médio-anterior curta; d2 aréola) (113x); E. Cabeça e mesossoma, mesopleura lisa, vista lateral (35x); F. Detalhe da mesopleura lisa (seta) (58x); G. Asa anterior

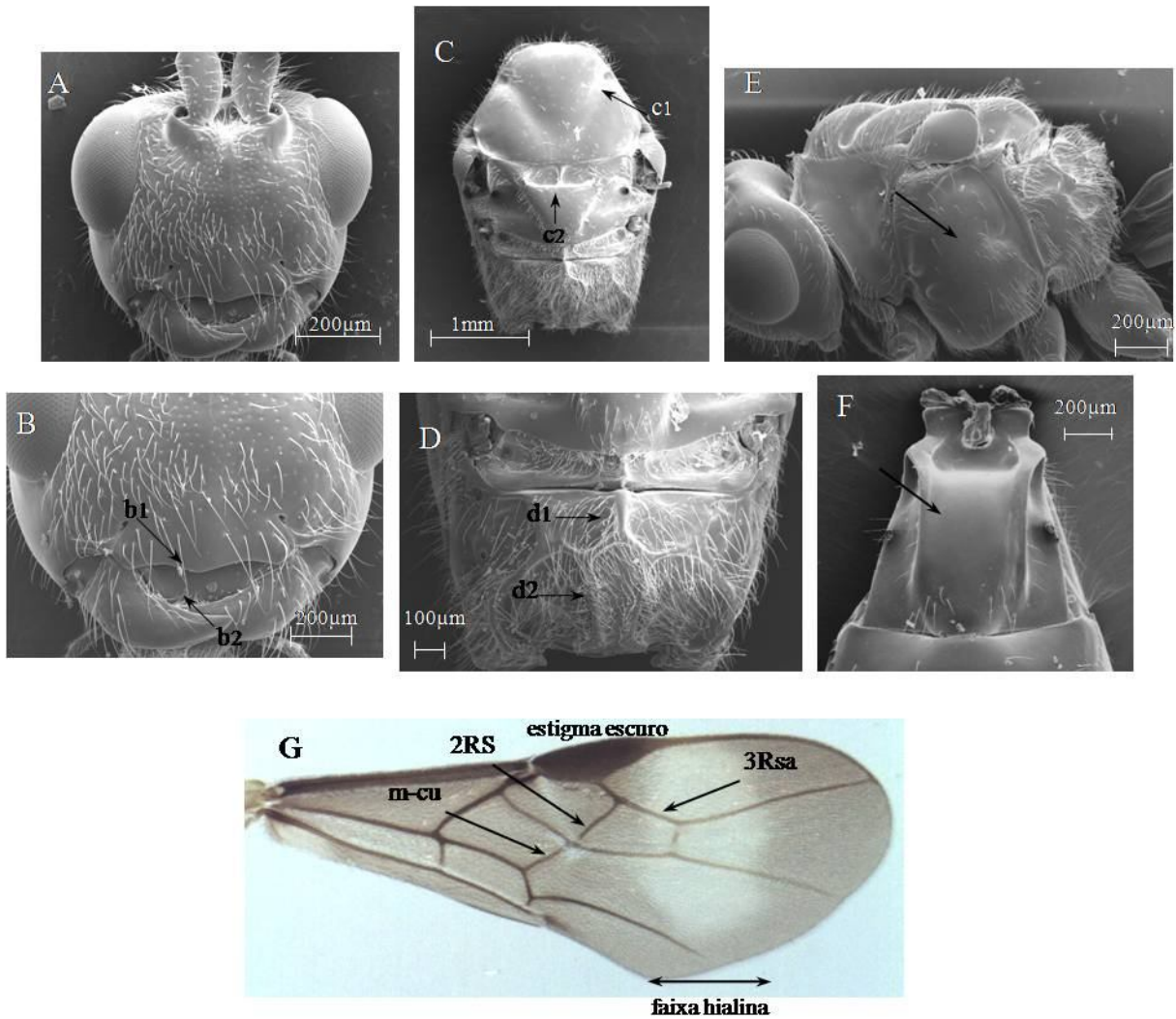


Figura 8 – *Doryctobracon* sp. 2. A. Cabeça, vista frontal (47x); B. Cabeça vista parcial (b1. Clípeo; b2. espaço entre clípeo e mandíbulas) (88x); C. Mesossoma, vista dorsal (c1. notáulices completas e não crenuladas; c2. sulco pré-escutelar com uma carena mediana transversal (38x); D. Propódeo (d1. Carena médio-anterior curta; d2 aréola) (78x); E. Cabeça e mesossoma, mesopleura lisa (seta), vista lateral (36x); F. Base do gáster (seta), vista dorsal (62x); G. Asa anterior

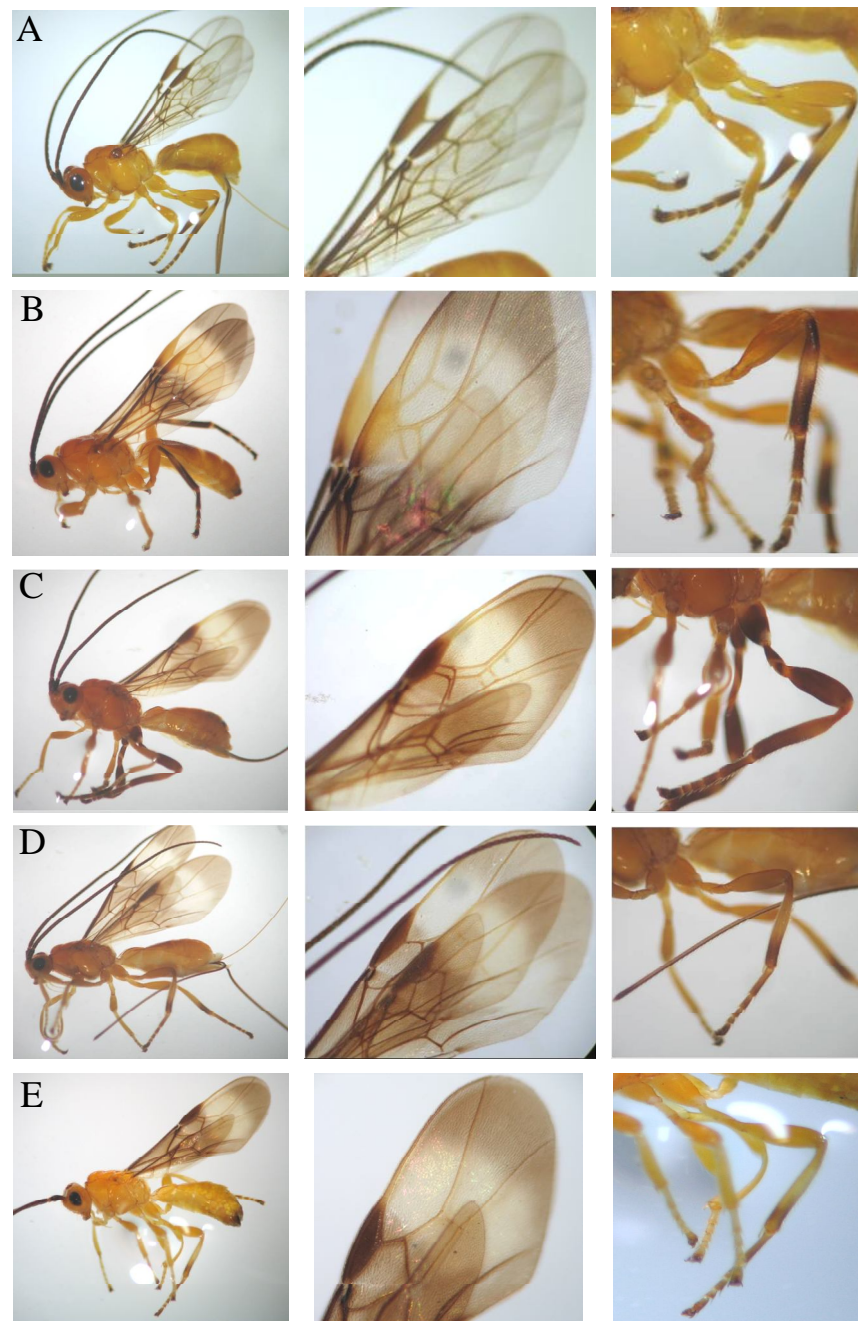


Figura 9 – Braconídeos parasitóides de moscas-das-frutas. A. *Doryctobracon areolatus*; B. *Doryctobracon* sp. 1 (Amapá); C. *Doryctobracon* sp. 2 (Goiás); D. *Doryctobracon* sp. 2 (Tocantins); E. *Doryctobracon* sp. 2 (Amapá). Ver detalhe da faixa hialina e variação na coloração das pernas posteriores (as figuras não estão em uma mesma escala)

4.2 Caracterização morfológica de *Opius bellus* Gahan e *Opius* sp.

Opius bellus não possui notáulices, apresenta sulco pré-escutelar com três carenas transversais (Figura 10C), mesopleura lisa (Figura 10E), propódeo liso com uma carena médio-longitudinal (Figura 10D), clípeo escondendo o labro com as mandíbulas fechadas, cabeça com protuberância mediana (Figura 10B), asa anterior com nervura m-cu alcançando a primeira célula submarginal (1st), presença da nervura (RS+M)b, segunda célula submarginal alongada (2nd) (Figura 10G), asa posterior sem segmento m-cu. Tíbias posteriores pretas e mesoescuto com padrão de cor variável, apresentando algumas vezes, manchas escuras (Figuras 11B e 11C; Figura 22) (WHARTON, 1997b).

Os exemplares semelhantes a *Opius bellus* com tíbias posteriores amareladas têm sido denominados *Opius* sp. ou *Opius* sp. aff. *bellus*, desde que foram estudados por Leonel Júnior (1991). Há divergências, se esses exemplares constituem uma espécie ou se são variação intraespecífica de *Opius bellus*. Neste trabalho, será usada a denominação de *Opius* sp. para esses exemplares.

Neste estudo, observou-se que os exemplares *O. bellus* e *Opius* sp. do AM e AP, além de apresentarem variações na coloração das tíbias posteriores, também apresentavam variações na coloração, que ainda não haviam sido documentadas, nos ápices das antenas, que podem ser claros ou totalmente escuros. Foi ainda possível verificar que não há correspondência entre, a coloração das tíbias posteriores com a coloração do ápice das antenas, podendo os indivíduos apresentar: tibia clara e antena com ápice claro; tibia clara e antena com ápice escuro; tibia escura e antena com ápice claro; tibia escura e antena com ápice escuro (Figura 11).

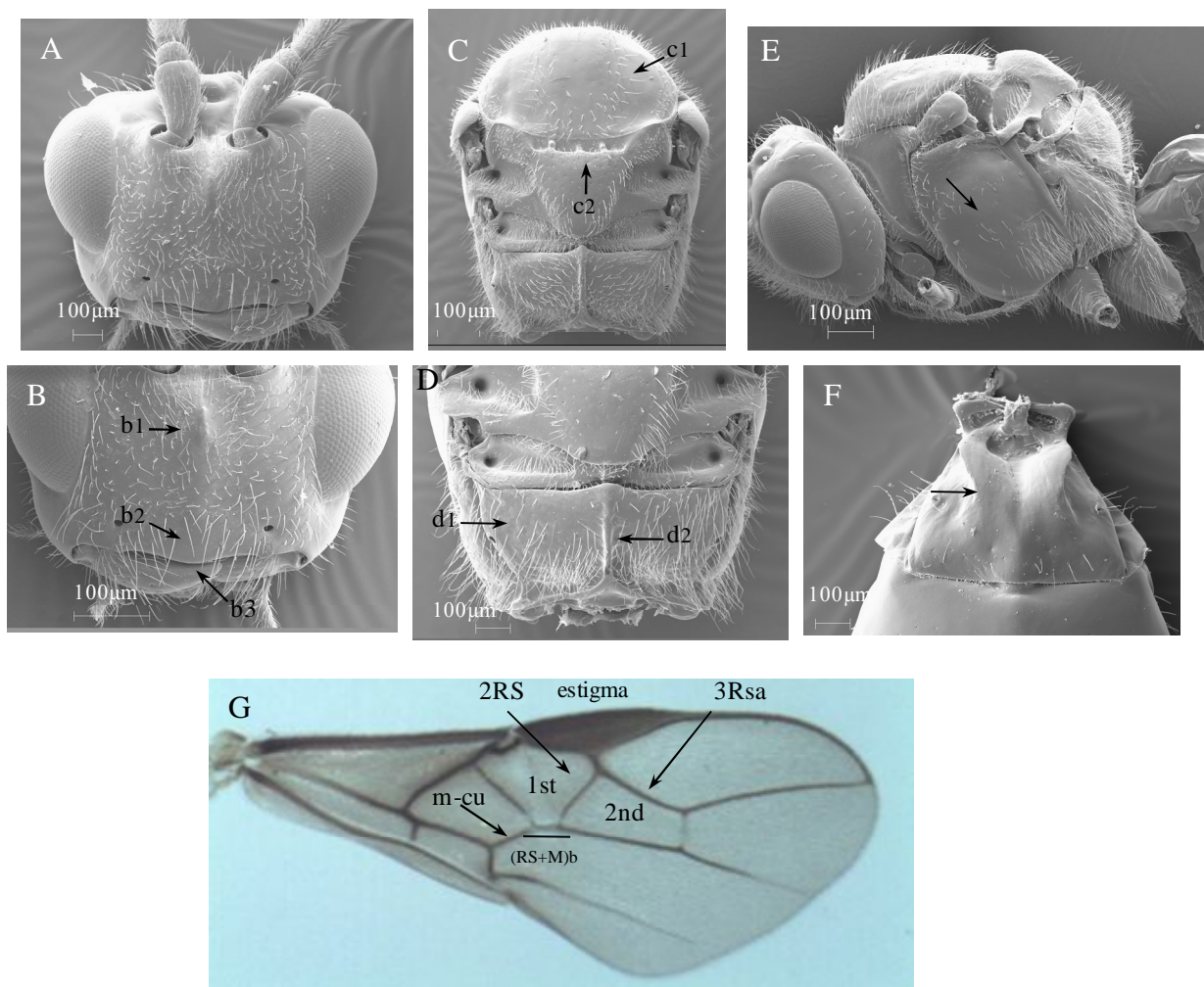


Figura 10 – *Opius bellus*. A. Cabeça, vista frontal (252x); B. Cabeça vista parcial (b1. protuberância mediana; b2. Clípeo; b3. abertura entre clípeo e mandíbula ausente) (304x); C. Mesossoma, vista dorsal (c1. notáulices ausentes; c2. sulco pré-escutelar com três carenas transversais (123x); D. propódeo (d1. propódeo liso; d2. carena médio-longitudinal) (275x); E. Cabeça e mesossoma, mesopleura lisa (seta), vista lateral (135x); F. Base do gáster (seta), vista dorsal (62x); G. Asa anterior

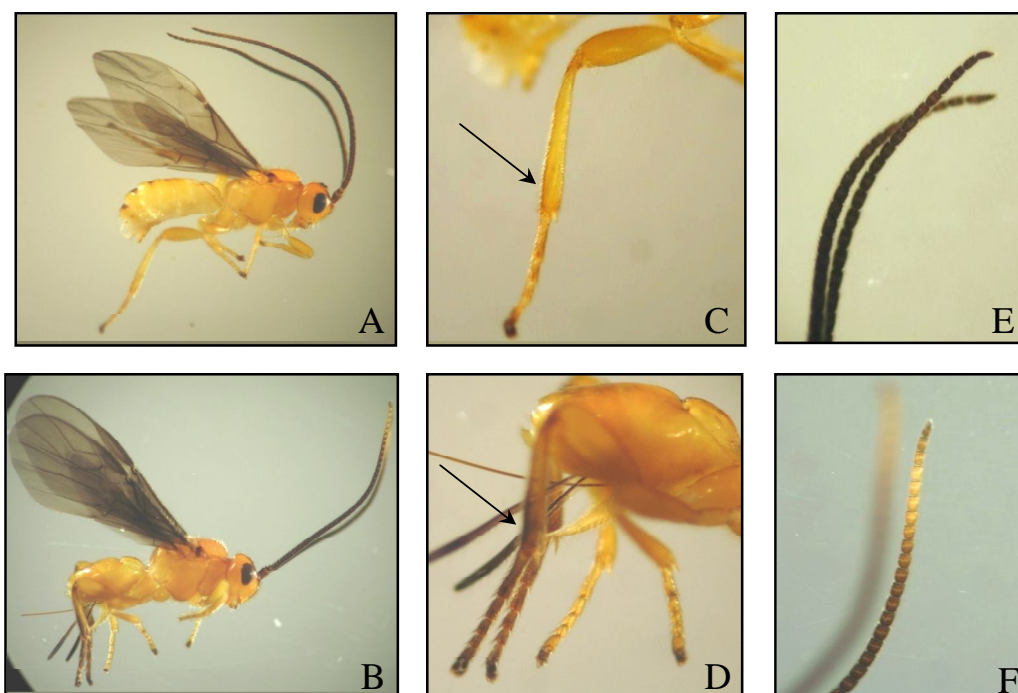


Figura 11 – A. *Opius* sp.; B. *Opius bellus*; C. tíbia posterior, clara; D. tíbia posterior, escura; E. antena, ápice escuro; F. antena, ápice claro (as figuras não estão em uma mesma escala)

4.3 Análises morfométricas

4.3.1 *Doryctobracon*

Analisaram-se as asas de 397 espécimes (196 de fêmeas e 201 de machos) de *D. areolatus*, provenientes de 11 estados brasileiros (RN, CE, BA, AM, AP, GO, TO, SP, RJ, MG, SC), de cinco espécimes (duas fêmeas e três machos) de *Doryctobracon* sp. 1 (AP) e de 74 espécimes (40 fêmeas e 34 machos) de *Doryctobracon* sp. 2 (GO e AP) (Tabela 2)

Tabela 2 – Procedência dos braconídeos (*Doryctobracon*) e respectivos códigos

LOCALIDADES	<i>Doryctobracon areolatus</i>			<i>Doryctobracon</i> sp. 1			<i>Doryctobracon</i> sp. 2		
	F	M	Códigos	F	M	Códigos	F	M	Códigos
NORDESTE									
Rio G. do Norte-RN	20	20	DARN	-	-	-	-	-	-
Ceará-CE	12	13	DACE	-	-	-	-	-	-
Bahia-BA	20	20	DABA	-	-	-	-	-	-
NORTE									
Amazonas-AM	20	20	DAAM	-	-	-	-	-	-
Macapá-AP	20	20	DAAP	2	3	DCAP	20	20	DEAP
CENTRO-OESTE									
Goiás-GO	20	20	DAGO	-	-	-	20	14	DEGO
Tocantins-TO	13	12	DATO	-	-	-	-	-	-
SUDESTE									
São Paulo-SP	20	20	DASP	-	-	-	-	-	-
Rio de Janeiro-RJ	20	20	DARJ	-	-	-	-	-	-
Minas Gerais-MG	20	17	DAMG	-	-	-	-	-	-
SUL									
Santa Catarina-SC	11	19	DASC	-	-	-	-	-	-
TOTAL	196	201		2	3		40	34	

4.3.1.1 Análises das variáveis canônicas (AVC)

A análise baseada nas variáveis canônicas VC1 e VC2, geradas por meio das coordenadas posicionais do plano cartesiano dos 20 pontos anatômicos da asa de machos e fêmeas de *D. areolatus*, *Doryctobracon* sp. 1 e *Doryctobracon* sp. 2, revelou dissimilaridades entre as populações analisadas. Os testes multivariados Wilks' Lambda ($P < 0,0001$), Pillai's Trace ($P < 0,0001$), Hotelling-Lawley Trace ($P < 0,0001$) e Roy's Greatest Root ($P < 0,0001$) mostraram que os eixos canônicos foram estatisticamente significativos.

Os gráficos de dispersão das populações de *D. areolatus* da região Norte (AP, AM), Nordeste (BA, RN, CE) e Centro-Oeste (GO, TO) apresentaram algumas semelhanças com os resultados das populações dessa espécie na região Sudeste (MG, SP, RJ) e Sul (SC) (Figuras 12 e 13). Algumas populações mostraram tendência de se separar, porém a maioria se sobrepôs, total ou parcialmente, tendendo a formar pequenas intersecções nos conjuntos populacionais. Nos gráficos de dispersão dos indivíduos no espaço das variáveis canônicas VC1 e VC2 de fêmeas e machos de *D. areolatus* do Norte (AP, AM), Nordeste (BA, RN, CE) e Centro-Oeste (GO, TO), foi observado que as populações do AM sobrepuseram cerca de 80% com a população do AP e cerca de 40% com a de GO. Há uma maior sobreposição da população de GO com a da BA (70%), além das populações do AM (40%) e do TO (10%). Com relação ao RN, ocorre ampla sobreposição com CE (60%), AM e AP (40%), GO (20%) e BA (10%) (Figura 12). Há uma tendência das populações de *D. areolatus* da BA, CE, AM e TO formarem conjuntos distintos, no entanto, a população do CE se mostra mais distante de todas, exceto pela tendência da população do RN agrupar-se em 60%.

Na projeção dos escores dos espécimes de *D. areolatus* das regiões Sudeste (MG, SP, RJ) e Sul (SC) no espaço das variáveis canônicas, o resultado se comporta semelhante às demais regiões analisadas, alguns conjuntos populacionais tendem à separação, como MG, SP e RJ, no entanto, há pequenas intersecções nesses conjuntos (Figura 13). A população de *D. areolatus* do RJ tem dispersão semelhante à de SC, ou seja, há sobreposição nesses conjuntos populacionais, e intersecção em 50% com a população de SP, porém em MG a sobreposição ocorre em torno de 10% com indivíduos das três populações analisadas (SP, RJ, SC).

No entanto, analisando-se os gráficos de dispersão das populações de *Doryctobracon* sp. 1 (estigma claro) e *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro), com relação às populações de *D.*

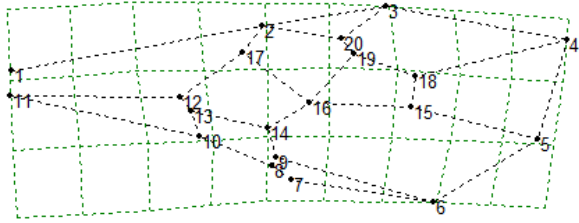
areolatus de mesma ocorrência dessas duas espécies, ou seja, AP e GO, além de uma população do Centro-Oeste (TO) e uma do Sudeste (SP), observou-se completa separação dos grupos populacionais no espaço das variáveis canônicas VC1 e VC2. Os espécimes denominados *Doryctobracon* sp. 1 (estigma claro), coletados apenas no estado do AP, formaram um grupo distinto de *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro) e de *D. areolatus*. Resultado semelhante foi encontrado para a espécie *Doryctobracon* sp. 2, que separou completamente dos demais indivíduos, porém a análise das populações dessa espécie coletadas nos estados de GO e AP sobrepueram-se completamente. Fato semelhante também ocorreu com as populações de *D. areolatus*, houve a formação de agrupamento distinto com as espécies de estigmas claro e escuro e sobreposição das populações dessa espécie nos estados de AP, TO, GO, e SP (Figura 14).

A partir da regressão dos valores de VC1 e VC2 sobre os componentes de forma, foram construídos os diagramas de deformação que se encontram ao redor dos gráficos das variáveis canônicas. Estes diagramas indicam a conformação alar dos indivíduos, conforme os valores das variáveis canônicas (VCs) ao longo dos eixos dessas variáveis, ou seja, quanto mais próximo dos extremos dos eixos das VCs estiver o indivíduo, as asas terão maior semelhança àquela conformação extrema (Figuras 12 a 14).

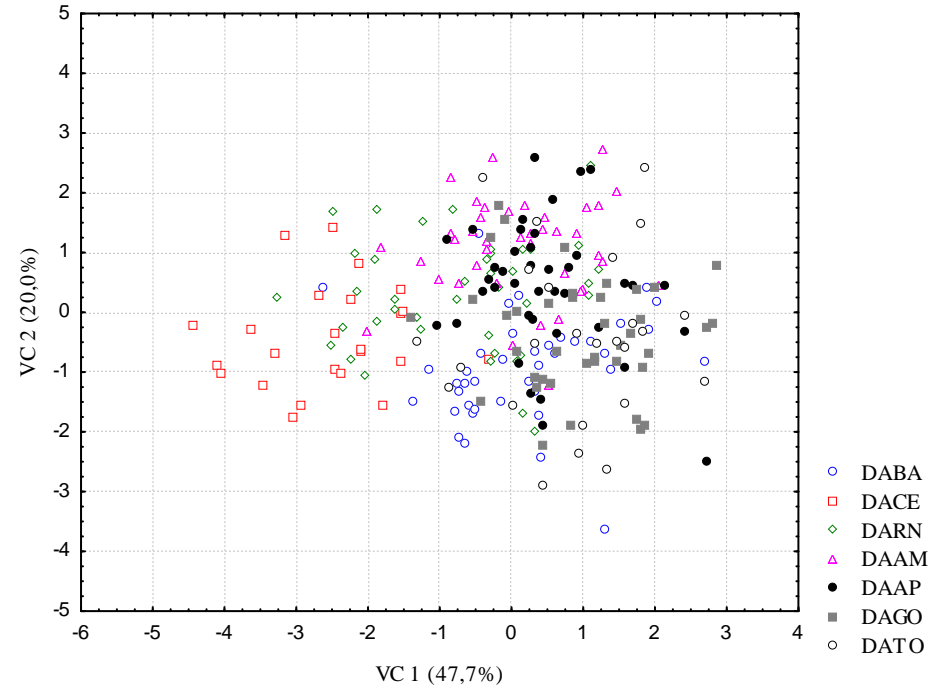
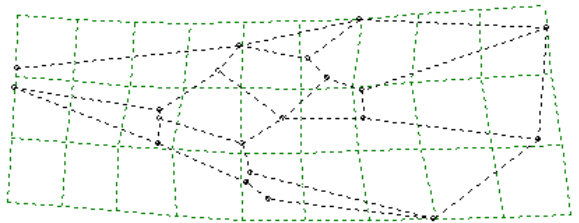
A análise dos diagramas de deformação nos permite observar as seguintes diferenças dentro das populações de *D. areolatus* das regiões Norte (AP, AM), Nordeste (BA, RN, CE) e Centro-Oeste (GO, TO) (Figura 12). O primeiro eixo canônico contém 47,7 % da variação entre os grupos relativa à variação dentro dos grupos, é observada a separação conspícua das populações do CE, e parcialmente da do RN, das populações da BA, AM, AP, GO e TO. Esse grupo de populações, como mencionado acima, sobrepõe-se consideravelmente, no eixo positivo da variável canônica 1, estando as populações ordenadas em um contínuo de variação na forma da asa ao longo desse primeiro eixo. É importante ressaltar que as deformações hipotéticas ao longo do primeiro e segundo eixos canônicos representam uma possível mudança na forma da asa prevista na variação dos escores dos dois primeiros eixos canônicos. Nos extremos inferior e superior do primeiro eixo canônico (VC1), as principais mudanças da asa estão associadas às nervuras 3RSb (intervalo dos marcos 4 e 18) e 3M (marcos 5 e 15), 1RS (marcos 2 e 17), 1cu-a (marcos 10 e 13), r (marcos 19 e 20), r-m (marcos 15 e 18) e 3CU (marcos 9 e 6). O resultado indica que as populações do RN e CE, localizadas no extremo inferior de VC1 (escore negativo), apresentam asas ligeiramente mais largas e mais curtas em relação às demais populações

localizadas no extremo superior de VC1 (escore positivo). A maior variação foi observada entre os marcos anatômicos 15 e 18, que representa a nervura r-m, ou seja, ocorreu alongamento da nervura resultante do afastamento desses pontos, permitindo o alargamento da região médio-apical da asa. A nervura 3CU (marcos 9 e 6) também encontra-se mais alongada contribuindo para esse formato. Outro fator a ser observado é o quase paralelismo encontrado entre as nervuras 3RSb (marcos 4 e 18) e 3M (marcos 5 e 15), contribuindo para que a borda apical da asa esteja mais arredondada. Devido ao deslocamento do eixo negativo, as demais populações localizadas no extremo superior de VC1 (escore positivo), apresentaram asas mais estreitas em virtude da aproximação dos marcos 15 e 18 (r-m), permitindo que as nervuras adjacentes se comprimam tornando o ápice da asa mais agudo. Nesse caso, os segmentos 3RSb (intervalo dos marcos 4 e 18), e 3M (marcos 5 e 15) formam quase um triângulo equilátero em função da aproximação dos marcos 15 e 18. As inclinações das nervuras 1cu-a (marcos 10 e 13), r (marcos 19 e 20) são opostas ao longo dos extremos inferior e superior de VC1. As duas primeiras variáveis canônicas explicaram 67,7% da variação total entre as populações do Norte, Nordeste e Centro-Oeste, sendo que o primeiro eixo canônico explicou 47,7% e o segundo 20,0% (Figura 12).

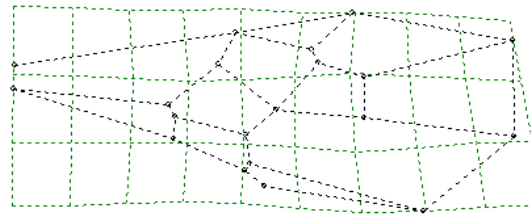
VC2 extremo superior



VC2 extremo inferior



VC1 extremo inferior



VC1 extremo superior

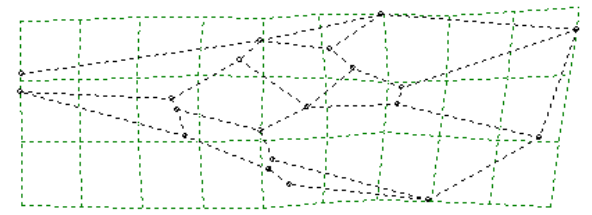
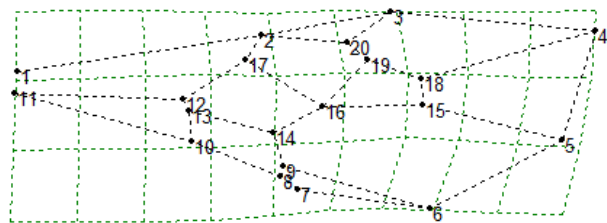


Figura 12 – Gráfico de dispersão de machos e fêmeas de *D. areolatus* do Norte (AM, AP), Centro-Oeste (GO, TO) e Nordeste (CE, RN, BA) no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas após análise de coordenadas posicionais em plano cartesiano de 20 pontos anatômicos da asa. Os diagramas de deformações ao redor do gráfico indicam as conformações alares presumíveis para indivíduos situados no extremo superior e inferior das variáveis canônicas. As magnitudes das deformações foram aumentadas em 3X para visualização

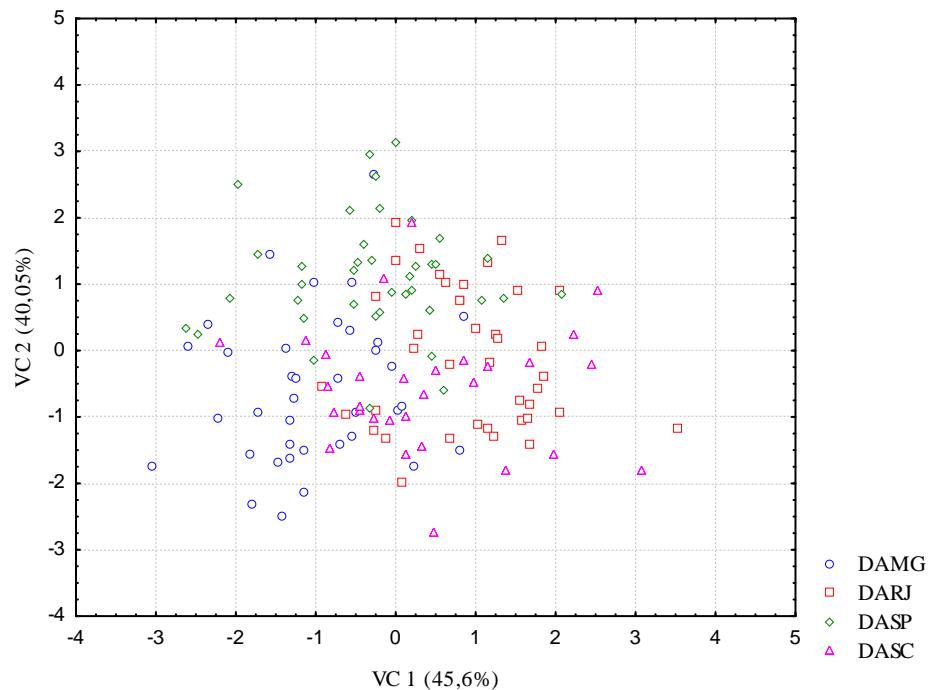
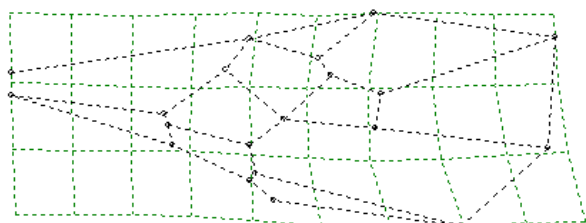
Para as populações de *D. areolatus* do Sudeste (MG, SP, RJ) e Sul (SC), a análise dos diagramas de deformação indica várias diferenças (Figura 13). O primeiro eixo canônico contém 45,6% da variação entre os grupos relativa à variação dentro dos grupos, foi observada a separação parcial da população de MG, com as populações do RJ e SC em relação ao primeiro eixo canônico (VC1). As populações desses dois estados, como mencionado acima, sobrepõem-se consideravelmente dentro do extremo superior do eixo canônico 1 (escore positivo), enquanto no extremo superior de VC2 (escore positivo), apesar da pequena sobreposição da população de SP com relação às demais populações (MG, RJ e SC), observa-se separação parcial com esses conjuntos populacionais. Nos extremos inferior e superior do primeiro eixo canônico (VC1), as principais mudanças da asa estão associadas às nervuras 3RSa (intervalo dos marcos 18 e 19), 3RSb (marcos 4 e 18), 2M (marcos 15 e 16), 3M (marcos 5 e 15), 3CU (marcos 9 e 6), 2CUa (marcos 14 e 9), r (marcos 19 e 20), R1a (marcos 3 e 4) e intervalo entre marcos 3 e 20 correspondente à metade posterior do estigma. O resultado indica que a população de *D. areolatus* de MG, localizada no extremo inferior de VC1 (escore negativo), apresenta formato semelhante às populações do RN e CE, ou seja, asas mais largas e curtas em relação à população do RJ e SC, localizadas no extremo superior de VC1 (escore positivo). A maior variação ocorreu entre os marcos anatômicos 19 e 20 representados pela nervura r, o afastamento desses pontos resultou no alongamento dessa nervura. Alongamento também foi observado na nervura 3CU (marcos 9 e 6), no entanto, as nervuras 2M (marcos 15 e 16) e 3RSa (marcos 18 e 19) são mais curtas, o mesmo ocorrendo entre as nervuras 3RSb (marcos 4 e 18) e 3M (marcos 5 e 15), a semelhança no tamanho desses últimos segmentos acarreta formato arredondado na margem apical da asa. Com o deslocamento do eixo negativo em direção ao eixo positivo de VC1, as populações do RJ e SC apresentam asas mais estreitas na região médio-apical em virtude da compressão das nervuras r (marcos 19 e 20) e 3CU (marcos 9 e 6). Outro fator, que possibilitou o alongamento da asa, foi o prolongamento dos segmentos 2M (marcos 15 e 16) e 3RSa (marcos 18 e 19) e 1RSa (marcos 3 e 4). A margem apical da asa, semelhante ao formato das populações do extremo superior de VC1 (Figura 12), apresenta ápice (marco 4) voltado para cima, pela diminuição do segmento 3M (marcos 5 e 15) em relação ao segmento 3RSb (marcos 18 e 4). Assim, é possível observar formato em ângulo, gerando deformação aguda no ápice da asa. Nos extremos inferior e superior de VC1, ocorre leve inclinação da nervura 2CUa (marcos 9 e 14), ao longo do eixo VC1.

No extremo superior do segundo eixo canônico (VC2), as principais mudanças, associadas à população de *D. areolatus* de SP, ocorrem nas nervuras 2CUa (marcos 9 e 6). Há forte deslocamento dessa nervura em direção à base, havendo compressão na região médio-ventral da asa, o ápice distal é ligeiramente mais estreito em virtude do alongamento da nervura 3RSb (marcos 4 e 18) e, em sentido contrário, compressão da nervura 3M (marcos 5 e 15), gerando formato angular na região apical da asa. É possível observar inclinação da nervura r-m (marcos 18 e 15), ao longo dos extremos inferior e superior de VC2. O resultado indica que a população de SP, localizada no extremo superior de VC2 (escore positivo), apresenta asas ligeiramente mais alongadas e estreitas em largura, semelhantes às populações de SC e RJ. A população de MG possui asas mais curtas e largas também no extremo inferior de VC2 (escore negativo). As duas primeiras variáveis canônicas explicaram 85,65% da variação total, sendo que a primeira canônica explicou 45,6% e a segunda, 40,05% (Figura 13).

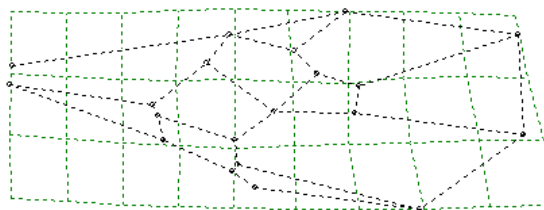
VC2 extremo superior



VC2 extremo inferior



VC1 extremo inferior



VC1 extremo superior

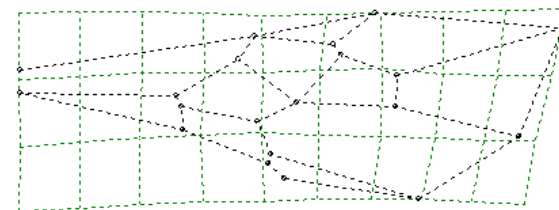


Figura 13 – Gráfico de dispersão para machos e fêmeas de *D. areolatus* do Sul (SC) e Sudeste (MG, SP, RJ) no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas após análise de coordenadas posicionais em plano cartesiano de 20 pontos anatômicos da asa. Os diagramas de deformações ao redor do gráfico indicam as conformações alares presumíveis para indivíduos situados no extremo superior e inferior das variáveis canônicas. As magnitudes das deformações foram aumentadas em 3X para visualização

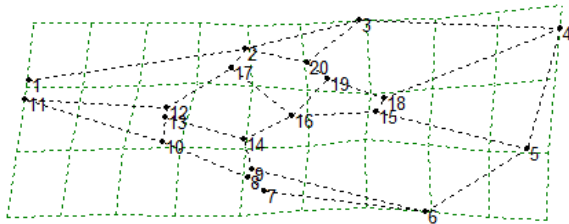
Os diagramas de deformação das populações de *Doryctobracon* sp. 1 (estigma claro), *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro) e *D. areolatus* de mesma ocorrência (AP, GO), juntamente com uma população do Centro-Oeste (TO) e uma do Sudeste (SP), apresentam várias diferenças quanto ao formato de suas asas (Figura 14). O primeiro eixo canônico contém 66,0 % da variação entre os grupos relativa à variação dentro dos grupos. É observada a separação marcante das populações de *Doryctobracon* sp. 1, *Doryctobracon* sp. 2, e *D. areolatus*, ocorrendo completa discriminação dos grupos em estudo. As populações estão ordenadas em um contínuo de variação na forma da asa ao longo do primeiro e segundo eixos canônicos VC1 e VC2. Nos extremos inferior e superior do primeiro eixo canônico (VC1), as mudanças no formato da asa estão associadas á diversas nervuras 1RS (intervalo dos marcos 2 e 17), 1M (marcos 12 e 17), intersecção das nervuras 1M e 1cu-a (marcos 12 e 13), 1cu-a (marcos 13 e 10), 2CUa (marcos 14 e 9), intersecção da nervura 3-1A com margem ventral da asa (marcos 8 e 7), 3CU (marcos 6 e 9), 2M (marcos 15 e 16), 3M (marcos 5 e 15), 3RSa (marcos 19 e 18), 3RSb (marcos 18 e 4), r (marcos 19 e 20). As populações localizadas no extremo inferior de VC1 (escore negativo), no caso, *Doryctobracon* sp. 2, apresentam asas mais alongadas, com região médio-basal da asa mais estreita e região médio-apical mais larga em relação a *D. areolatus* localizada, no extremo superior de VC1 (escore positivo). Na região médio-basal da asa ocorre compressão das nervuras, resultando em diminuição no comprimento, e assim, provocando um estreitamento na base da asa. As nervuras que contribuíram melhor para esse fato foram 1cu-a (marcos 13-10), intersecção das nervuras 1M e 1cu-a (marcos 12 e 13), intersecção da nervura 3-1A com margem ventral da asa (marcos 8 e 7), 2CUa (marcos 14 e 9). Porém, na região médio-apical da asa ocorre o oposto, ou seja, as nervuras sofrem alongamento permitindo que a base se apresente mais larga, essa mudança foi ocasionada principalmente pelo aumento no comprimento das nervuras CU (marcos 9 e 6), 2M (marcos 15 e 16), 3M (marcos 5 e 15), 3RSa (marcos 19 e 18), 3RSb (marcos 18 e 4). Com o deslocamento do eixo negativo em direção ao eixo positivo de VC1, observa-se que as populações de *D. areolatus* localizadas nesse eixo apresentam asas mais curtas, devido ao alargamento da região médio-basal e estreitamento da região médio-apical em relação a *Doryctobracon* sp. 2, localizado no eixo negativo de VC1, ocorrendo, portanto, uma inversão no formato da asa. O alargamento da região médio-basal ocorre, devido ao alongamento das nervuras 1cu-a (marcos 13-10), 3RSb (marcos 18 e 4), intersecção da nervura 3-1A com margem ventral da asa (marcos 8 e 7), intersecção das nervuras 1M e 1cu-a (marcos 12 e 13). Todavia, na região

médio-apical da asa ocorre o oposto, ou seja, as nervuras sofrem diminuição no comprimento, e assim a base fica mais estreita, com a maior variação observada ao redor das nervuras r (marcos 20 e 19), 3RSa (marcos 19 e 18), 3RSb (marcos 18 e 4), 2M (marcos 15 e 16), 3M (marcos 5 e 15), 3CU (marcos 9 e 6). É importante ressaltar que a nervura 3cu-a (marcos 10 e 13) desloca-se no sentido oposto aos eixos positivo e negativo de VC1.

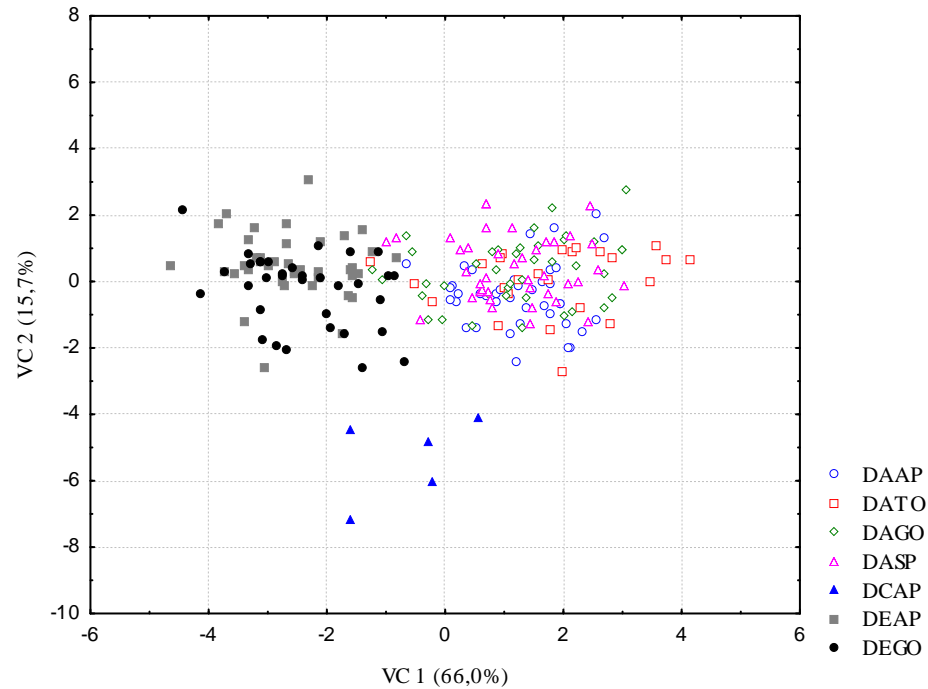
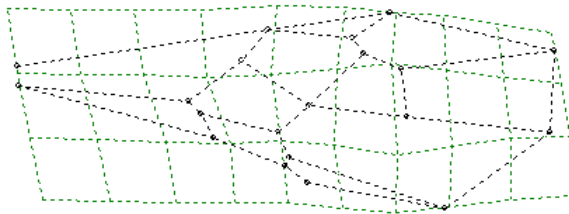
No segundo eixo canônico a variação foi de 15,7%, observa-se ao longo dos eixos positivo e negativo que as populações de *Doryctobracon* sp. 2 e *D. areolatus* encontram-se agrupadas no centro do eixo de VC2, não sendo possível identificar continuidade de variação morfológica que pudesse discriminar esses espécimes nesse segundo eixo canônico. Todavia, no extremo inferior do segundo eixo canônico (VC2) (escore negativo), observa-se que *Doryctobracon* sp. 1 apresenta formato da asa relacionado a esse eixo, diferente do encontrado em VC1, onde não foi possível ser visualizado. A asa é alongada, porém ocorrem mudanças conspícuas na região médio-apical e observa-se que nessa região, juntamente com a margem lateral, uma leve depressão na margem dorsal-lateral, em relação ao formato das asas de *Doryctobracon* sp. 2 e *D. areolatus*. As principais mudanças que contribuem para esse formato estão associadas às nervuras 3RSa (marcos 18 e 19), 3RSb (marcos 18 e 4), 2M (marcos 15 e 16), 3M (marcos 15 e 5), r-m (marcos 18 e 15), 2RS (marcos 19 e 16), 3CU (marcos 9 e 6), 1cu-a (marcos 10 e 13), 1RS (marcos 2 e 17) e R1a (marcos 3 e 4). Na região médio-apical da asa, é possível visualizar a depressão em virtude da diminuição do ângulo entre as nervuras 1RS e 3RSb. Contribui também para essa modificação o quase paralelismo encontrado entre as nervuras 3RSb (marcos 18 e 4) e 3M (marcos 15 e 5), que se mostram equidistantes e quase paralelas em virtude da nervura r-m (marcos 18 e 15) e 2RS (marcos 2 e 16) serem igualmente alongadas e quase paralelas, permitindo a depressão na margem lateral da asa, contribuindo para que o marco 3, presente no final do estigma, torna-se mais côncavo, em relação à forma das asas de *Doryctobracon* sp. 2 e *D. areolatus*. Outro ponto destacado na diferença entre as asas de *Doryctobracon* sp. 1 e *Doryctobracon* sp. 2 é o deslocamento oposto da nervura 1cu-a (marcos 10 e 13) e intersecção da nervuras 1M e 1cu-a (marcos 12 e 13). Todavia, é importante salientar a modificação da célula submarginal (2nd) nessas espécies. A célula submarginal em *Doryctobracon* sp. 1 possui formato que lembra um trapézio, com os segmentos 2RS e r-m (respectivamente marcos 16-19 e 18-15) bastante alongados, em relação às outras espécies; o segmento 3RSa (marcos 19 e 18) é bem menor em relação ao segmento 2M (marcos 16 e 15). Em *Doryctobracon* sp. 2, a segunda célula

submarginal (2nd) possui formato que lembra um retângulo. Os segmentos 2RS e r-m (respectivamente marcos 16-19 e 18-15) apresentam quase o mesmo comprimento, e a nervura 3RSa (marcos 19 e 18) é levemente maior que o segmento 2M (marcos 16 e 15), estando quase paralelas. Porém, em *D. areolatus*, o segmento 3RSa (marcos 19 e 18) é menor em relação à 2M (marcos 16 e 15), assim como o segmento 2RS (marcos 19 e 16) é maior e mais inclinado em relação à nervura r-m (marcos 18 e 15). Em *Psytalia* Walker, a principal alteração que possibilitou a separação de populações e suas espécies, centrou na segunda célula submarginal (2nd) (BILLAH et al., 2008). Segundo aquele autor, essa afirmação foi consistente e confirmou a forte dependência na utilização da forma e tamanho da segunda célula submarginal, como um dos caracteres mais práticos e confiáveis para a identificação taxonômica de representantes de Opiinae.

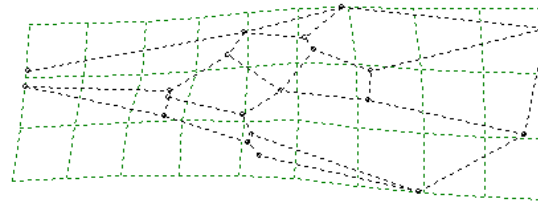
VC2 extremo superior



VC2 extremo inferior



VC1 extremo inferior



VC1 extremo superior

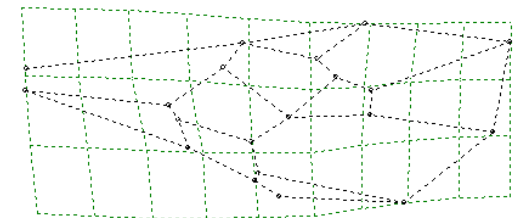


Figura 14 – Gráfico de dispersão de machos e fêmeas de *Doryctobracon areolatus* (AP, TO, GO, SP) *Doryctobracon* sp. 1 (AP) (DCAP), *Doryctobracon* sp. 2 (AP, GO) (DEAP e DEGO) no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas após análise de coordenadas posicionais em plano cartesiano de 20 pontos anatômicos da asa. Os diagramas de deformações ao redor do gráfico indicam as conformações alares presumíveis para indivíduos situados nos extremos superior e inferior das variáveis canônicas. As magnitudes das deformações foram aumentadas em 3X para visualização

4.3.1.2 Análise de agrupamento

Os valores das distâncias de Mahalanobis (Tabela 3), calculados a partir dos componentes de forma das populações de machos e fêmeas de *D. areolatus* de 11 estados brasileiros, *Doryctobracon* sp. 1 (estigma claro) (AP) e *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro) (AP, GO), foi utilizada na análise de *cluster* (UPGMA), onde foi gerado o dendograma (Figura 15). Não foi possível visualizar ordenação regional nas populações de *D. areolatus*. De acordo com a análise das distâncias de Mahalanobis, observa-se que as populações distantes geograficamente apresentam similaridade morfológica no dendograma, a exemplo do que ocorre com as populações da BA e SC (Nordeste e Sul), RN e AM (Nordeste e Norte), a população do CE (Nordeste) foi a mais distante de todas. Apesar de essa população ter sido visualizada como próxima à do RN, no gráfico de dispersão (Figura 12), foi possível verificar, na análise de *cluster*, que essa população apresentou maior similaridade com a população de MG (Sudeste). Os gráficos de dispersão das variáveis canônicas para *D. areolatus* foram gerados separadamente com base nas regiões geográficas (Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul), pois o agrupamento das 11 populações geraria um gráfico difícil de ser visualizado e interpretado. Assim, o dendograma possibilitou a determinação da proximidade das populações dessa espécie nas outras regiões, demonstrando, portanto, a ocorrência de variabilidade interpopulacional em *D. areolatus*.

Analisando-se *D. areolatus* (Szépligeti), *Doryctobracon* sp. 1 (estigma claro) e *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro), novamente observa-se a formação de agrupamentos distintos para essas espécies. Na análise de *cluster* das distâncias de Mahalanobis, verifica-se que as 11 populações de *D. areolatus* encontram-se agrupadas e separadas das espécies *Doryctobracon* sp. 1 (estigma claro), e *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro), neste caso, foi possível verificar a proximidade entre as populações de estigma escuro provenientes do AP e GO, e a distinta separação da população de estigma claro das demais espécies estudadas (Figura 15).

Neste estudo, o maior distância de Mahalanobis foi entre *Doryctobracon* sp 1. (estigma claro) com as demais populações de *D. areolatus* (Szépligeti), principalmente com a população de SC (42,97%). A população do Ceará foi a menos distante com relação a essa espécie (17,16%). *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro), proveniente de Goiás e Tocantins, apresentou valores similares, quanto a distância, com as populações de *D. areolatus*. Porém, a distância de Mahalanobis entre as espécies de estigma claro e escuro é bastante ampla, *Doryctobracon* sp.1 -

Doryctobracon sp. 2 (AP) 41,51%, e *Doryctobracon* sp. 1 - *Doryctobracon* sp. 2 (GO) 37,97%, indicando extensa variação entre as populações (Tabela 3). Os resultados das análises morfométricas apontam à existência de variabilidade interpopulacional na morfologia das asas de *D. areolatus* (Szépligeti) pertencentes as cinco regiões brasileiras, pois não foi possível observar um padrão morfométrico geográfico entre as populações dessa espécie nas diferentes regiões, em relação à configuração da asa. As análises também revelaram que as populações de *Doryctobracon* sp. 1, *Doryctobracon* sp. 2 são morfologicamente distintas entre si e distintas de *D. areolatus* (Szépligeti), evidenciando, de fato, a existência de duas espécies novas, *Doryctobracon* sp. 1 (estigma claro) e *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro), que se diferenciam completamente de *D. areolatus* (Szépligeti).

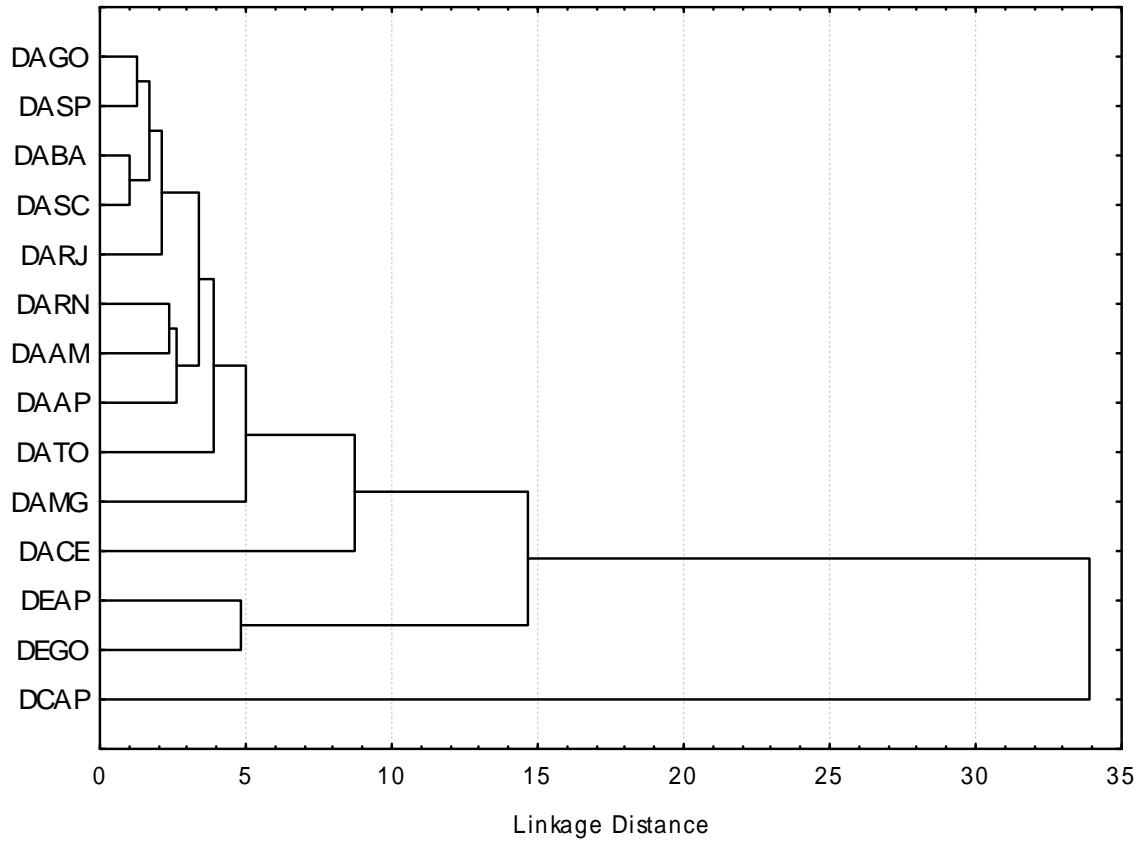


Figura 15 - Dendrograma para machos e fêmeas de *D. areolatus* do Norte (AM, AP), Centro-Oeste (GO, TO), Nordeste (CE, RN, BA) Sudeste (MG, SP, RJ) e Sul (SC), *Doryctobracon* sp. 1 (estigma claro) (DCAP), *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro) (DEAP e DEGO) gerados por análise de *cluster* (UPGMA) a partir de distâncias de Mahalanobis apresentadas na Tabela 3

Tabela 3 - Distâncias de Mahalanobis de machos e fêmeas de *D. areolatus* do Norte (AM, AP), Centro-Oeste (GO, TO), Nordeste (CE, RN, BA) Sudeste (MG, SP, RJ) e Sul (SC), *Doryctobracon* sp. 1 (estigma claro) (DCAP), *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro) (DEAP e DEGO) calculados a partir dos componentes de forma das asas

Espécies	DAGO	DATO	DABA	DACE	DARN	DAAM	DAAP	DAMG	DARJ	DASP	DASC	DCAP	DEAP	DEGO
DAGO	0.00													
DATO	2.13	0.00												
DABA	1.25	3.62	0.00											
DACE	9.93	10.78	8.51	0.00										
DARN	2.92	3.16	3.02	5.33	0.00									
DAAM	3.55	5.63	3.99	8.37	2.35	0.00								
DAAP	1.49	3.75	2.29	9.34	2.50	2.76	0.00							
DAMG	4.11	6.74	2.91	5.00	4.97	7.12	6.44	0.00						
DARJ	2.97	5.45	1.74	9.26	2.43	4.11	3.22	5.01	0.00					
DASP	1.29	2.77	1.44	10.32	3.04	3.85	3.03	4.17	1.81	0.00				
DASC	1.96	4.83	1.02	10.23	4.21	5.48	4.56	3.15	1.91	2.07	0.00			
DCAP	38.29	36.90	36.11	17.16	27.01	31.17	32.28	31.80	32.81	34.66	42.97	0.00		
DEAP	14.50	20.56	11.49	20.11	16.65	14.84	16.03	16.53	9.77	13.13	11.22	41.51	0.00	
DEGO	13.30	18.80	12.27	16.84	15.15	11.23	14.31	16.28	12.35	13.41	13.32	37.97	4.85	0.00

4.3.1.3 Considerações geográficas

As espécies utilizadas neste estudo foram coletadas aleatoriamente, ou seja, algumas populações não apresentaram a origem da cidade correspondente não sendo possível determinar a latitude local. Os frutos foram coletados quando disponíveis, sem nenhuma preocupação quanto a associação com a larva da mosca hospedeira. Estas informações são essenciais para a mensuração das variações morfológicas, dentro das populações, pois as características morfométricas são bastante plásticas e muito sensíveis às condições ambientais (GIBERT et al., 2004). Assim, é importante atentar sobre a origem geográfica dessas espécies. O fato de o Brasil apresentar extensão continental permite que haja uma diversificação climática bastante ampla, influenciada pela configuração geográfica, significativa extensão costeira, relevo e dinâmicas de massas de ar pelo seu território, sendo este último fator de grande importância, pois atua diretamente sobre as temperaturas e índices pluviométricos nas diferentes regiões do país, além de fatores como altitude, latitude, condições de relevo, e continentalidade promoverem variação e complexidade nos ecossistemas (http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Climas_no_Brasil&oldid=13111809). Tem sido demonstrado que as diferenças morfométricas existentes entre indivíduos de mesma espécie são, muitas vezes, modeladas por especiação divergente e adaptações ecológicas, em particular a expressão de numerosas características morfológicas podem ser fortemente influenciadas pelo ambiente larval e especialmente pela temperatura (GIBERT et al., 2004).

A modificação no tamanho e forma das asas foi estudada em *Pnigalio soemius* (Walker) (Hymenoptera: Eulophidae), ectoparasitóide de lepidópteros e de dípteros minadores de folha, quando foi criado em diferentes temperaturas (10°C a 30°C) em único hospedeiro *Cosmopterix pulchrimella* (Chambers) (Lepidoptera: Cosmopterigidae). Constatou-se que o comprimento da asa anterior de *P. soemius* foi menor em indivíduos criados a 30°C, a nervura marginal apresentou curvatura de formato côncavo e maior comprimento em temperaturas intermediárias (BERNARDO; PEDATA; VIGGIANI, 2007). *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti), por ser parasitóide obrigatório de larvas de moscas-das-frutas, está sujeito aos recursos nutricionais disponíveis da larva a ser parasitada, portanto, poderá encontrar um ambiente nutricional variável, podendo sofrer com prováveis modificações encontradas nesse ambiente (BEZEMER; HARVEY; MILLS, 2005). Para um bom desenvolvimento da larva hospedeira, o tipo de fruto, no qual se alimenta, deve ser considerado. Às vezes, o fruto não é específico ou apresenta valor nutricional inferior, por causa da

época de escassez anual de frutas de hospedeiros primários para a oviposição, ficando a mosca hospedeira sujeita a ovipositar em frutos de qualidade nutricional baixa e, conseqüentemente, gerar indivíduos menores. Além disso, as preferências do parasitóide pela espécie de larva hospedeira, também afeta diretamente o desenvolvimento desses insetos (LAWRENCE; BARANOWSKI; GREANY, 1976; BILLAH et al., 2005). Assim, a influência do hospedeiro em relação ao tamanho do parasitóide, pode resultar em alterações morfológicas. É o que foi observado quando se estudou a influência de diferentes hospedeiros larvais sobre os parasitóides *Psytalia concolor* (Szépligeti), *P. cosyrae* (Wilkinson) e *P. lounsburyi* (Silvestri) (Hymenoptera: Braconidae). Ficou constatada a correspondência entre o tamanho do parasitóide e o peso do pupário, sugerindo que o tamanho do parasitóide produzido, pode depender da quantidade de recurso alimentar contido na larva hospedeira. Em *P. concolor* (Szépligeti), criado em larvas hospedeiras maiores, resultou um maior tamanho na asa, porém *P. cosyrae* (Wilkinson) exibiu diferenças alométricas quando foi criada em seu hospedeiro não-preferencial, *C. capitata* (Wiedemann), relativamente menor (BILLAH et al., 2005). Em um estudo similar com *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), constatou-se que o parasitóide atingiu tamanho maior quando foi criado em larvas de *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae), do que em *A. obliqua* (Macquart), onde o parasitóide apresentou um volume relativamente menor (EBEN et al., 2000). No presente estudo, por ter sido gerado resultado bastante variável, provavelmente a temperatura e o tipo de hospedeiro possam ter influenciado nas alterações morfológicas e no tamanho das asas de *D. areolatus* (Szépligeti), porém não foi possível quantificar essa modificação, pois os insetos não foram criados em condições térmicas controladas, mas coletados em diferentes épocas do ano, além de não ter sido feita a associação com nenhuma larva hospedeira. Já foi constatada variações no tamanho de *D. areolatus* (Szépligeti) obtidos de diferentes frutos (LEONEL JUNIOR, 1991; CANAL DAZA et al., 1994)

4.3.1.4 Dimorfismo sexual

O grau de dimorfismo sexual entre *D. areolatus* de 11 populações brasileiras e *Doryctobracon* sp. 2 (AP e GO), foram analisadas com base no tamanho do centróide, que representa o centro de massa de uma configuração, essencial para a definição de tamanho. Na morfometria geométrica, o tamanho da estrutura analisada é definido em termos de tamanho do

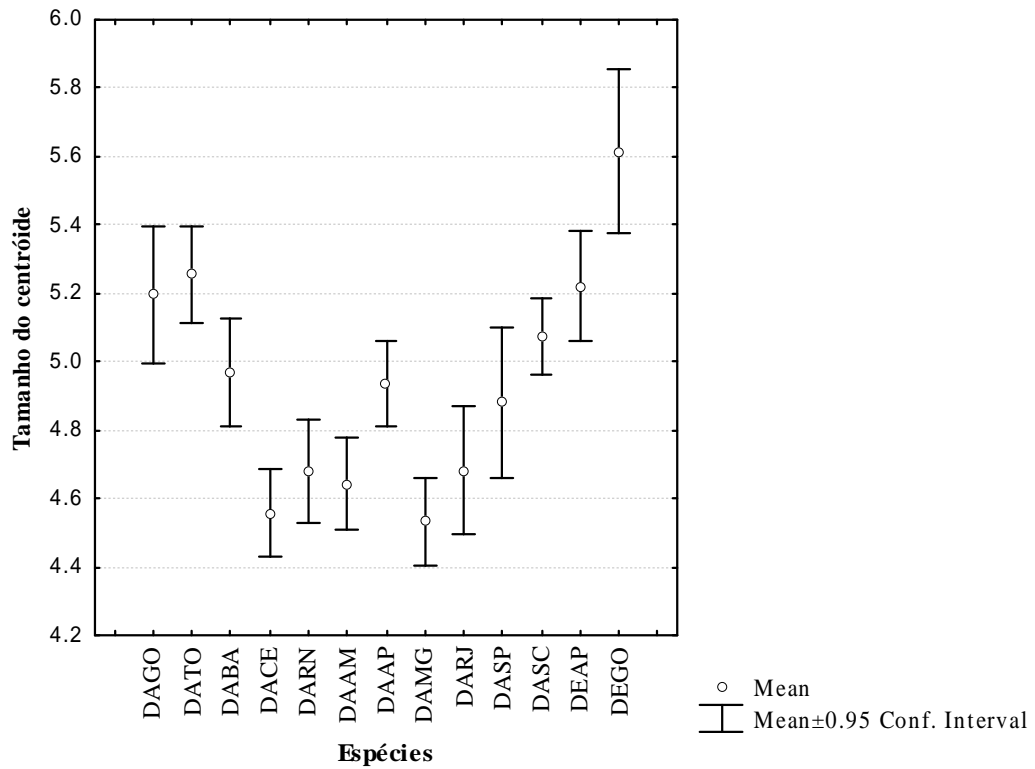
centróide (MONTEIRO; REIS, 1999). Assim, foram construídos gráficos das médias e desvios-padrões (intervalo de confiança a 95%) dos tamanhos dos centróides das populações de machos e de fêmeas de *D. areolatus* (Szépligeti) e *Doryctobracon* sp. 2. O resultado aponta a existência de dimorfismo sexual, com relação ao tamanho, nas espécies estudadas, i.e, fêmeas com asas relativamente maiores que as dos machos. Nas populações de *D. areolatus* (Szépligeti), machos e fêmeas apresentaram padrão semelhante no tamanho de suas asas, porém na população de GO os machos e as fêmeas apresentaram asas relativamente maiores que as demais populações dos outros estados, enquanto a população do CE possui asas relativamente menores. Com relação a *Doryctobracon* sp. 2, as fêmeas também possuíram asas maiores do que os machos, porém suas asas, em relação a *D. areolatus* (Szépligeti) são maiores (Figura 16). *Doryctobracon* sp. 1 foi excluída das análises devido ao pequeno número de exemplares disponíveis.

É importante enfatizar que esse estudo não teve como objetivo determinar a ocorrência de dimorfismo sexual e sim tentar discriminar espécies e avaliar o comportamento das populações nas diferentes regiões geográficas. Portanto, apesar de ficar demonstrada a presença de dimorfismo sexual, com relação ao tamanho, as nervuras que determinam a separação de machos e fêmeas não foram avaliadas. Pretorius (2005) investigou a extensão das similaridades e diferenças na forma da asa anterior de machos e fêmeas de 24 espécies do gênero *Tachyspex* Kohl (Hymenoptera: Sphecidae) e concluiu que existem diferenças significativas em pequena escala entre os marcos dos sexos masculino e feminino. O autor sugeriu o dimorfismo sexual é importante, no estudo da morfologia da asa para a distinção de espécies, sendo interessante fazer o estudo de discriminação levando-se em consideração um dos sexos, por causa da provável existência de dimorfismo entre indivíduos da mesma espécie. Concluiu que deve ser feita análise em separado de machos e fêmeas, pois é possível serem encontradas mudanças sutis na forma das asas de machos e fêmeas, e a inclusão de ambos nas análises de discriminação poderiam gerar falsos resultados. Apesar de, nesse estudo, terem sido utilizados ambos os sexos e por causa do pequeno número de exemplares da espécie de estigma claro (5), os resultados das análises para discriminação das espécies de *Doryctobracon* sp. 1 e *Doryctobracon* sp. 2 não foi prejudicada.

O dimorfismo sexual em relação ao tamanho certamente podem estar relacionadas ao valor adaptativo das fêmeas, e provavelmente alocação de recursos nutricionais para progênie. Costa; Moura; Mateus (2007) demonstraram por meio da morfometria geométrica das asas de *Drosophila antonietae* Tidon-Sklorz & Sene o dimorfismo sexual com relação ao tamanho, ou

seja, as fêmeas apresentavam asas maiores que os machos. Aqueles autores sugeriram três hipóteses para explicar o dimorfismo: a primeira estaria relacionada com uma seleção positiva em relação ao tamanho da fêmea, ligada ao benefício da fecundidade, apresentando a idéia de que fêmeas maiores são selecionadas por apresentar maior fecundidade; a segunda refere-se à seleção negativa de tamanho em direção ao macho, ou seja, ela poderia estar ligada a protandria, na qual machos menores, que apresentam um menor tempo de desenvolvimento, são recrutados mais cedo pela população; e finalmente a terceira hipótese, refere-se à inércia filogenética, supondo que o dimorfismo sexual, tem herança ancestral e a espécie não apresentou nenhuma resposta. A asa também é uma estrutura extremamente importante na comunicação entre indivíduos da mesma espécie, por exemplo, em *Drosophila* a forma da asa está vinculada ao comportamento de corte para o acasalamento, os batimentos das asas geram uma vibração característica da espécie, essencial para o reconhecimento intraespecífico (MENEZES et al. 2008). *Diachasmimorha longicaudata* (Ashmead), tem uma resposta sexual dimórfica às transmissões registradas, “sons de aproximação”, sugerindo uma função sexual. Os machos dessa espécie apresentam asas mais ovais que as fêmeas, sinalizando em alguns casos como os dípteros (SIVINSKI; WEBB, 1989).

A



B

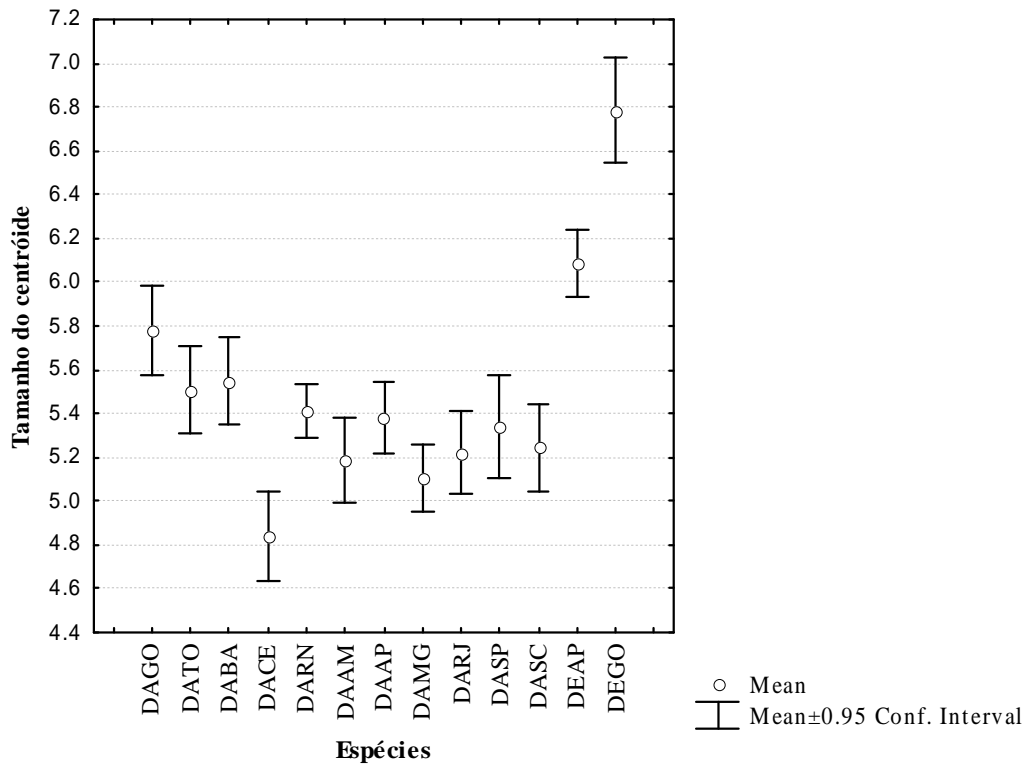


Figura 16 - Tabela de médias e desvios-padrão dos tamanhos dos centróides calculados a partir das asas (A) machos e (B) fêmeas de *Doryctobracon areolatus* (GO, TO, BA, CE, RN, AM, AP, MG, RJ, SP, SC) e *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro) (AP, GO)

4.3.2 *Opius*

Populações de *Opius bellus* Gahan e de *Opius* sp. provenientes de três estados brasileiros (AM, AP e RN), foram estudados por meio da análise de morfometria geométrica. Foram analisadas as asas de 201 espécimes, sendo 104 (60 fêmeas e 47 machos) de *O. bellus* Gahan e 94 (50 fêmeas e 44 machos) de *Opius* sp. (Tabela 4).

Tabela 4 - Procedência dos braconídeos (*Opius*) e respectivos códigos

Estados	<i>Opius bellus</i>			<i>Opius</i> sp.		
	F	M	Códigos	F	M	Códigos
NORTE						
Manaus – AM	20	20	OBAM	20	20	OPBAM
Macapá – AP	20	19	OBAP	20	18	OPBAP
NORDESTE						
Rio G. do Norte - RN	20	8	OBRN	10	6	OPBRN
TOTAL	60	47		50	44	

4.3.2.1 Análises das variáveis canônicas (AVC)

As análises baseadas nas variáveis canônicas VC1 e VC2, geradas por meio das coordenadas posicionais do plano cartesiano dos 20 pontos anatômicos da asa de machos e fêmeas de *O. bellus* Gahan e de *Opius* sp. dos estados AP, AM e RN, revelaram dissimilaridades entre as populações analisadas. Os testes multivariados Wilks' Lambda ($P < 0,0001$), Pillai's Trace ($P < 0,0001$), Hotelling-Lawley Trace ($P < 0,0001$) e Roy's Greatest Root ($P < 0,0001$) mostraram que os eixos canônicos foram estatisticamente significativos.

As duas primeiras variáveis canônicas explicaram 87,20% da variação total, a primeira explicou 55,1% e a segunda 32,1% dessa variação. O gráfico de dispersão das populações de *O. bellus* Gahan e *Opius* sp. do AP, AM e RN projetadas nos eixos das variáveis canônicas VC1 e VC2, mostraram que as populações de *O. bellus* e *Opius* sp. se sobrepõem completamente nos estados do AP e AM, no entanto, no RN a sobreposição desse táxon é parcial (em torno de 10%),

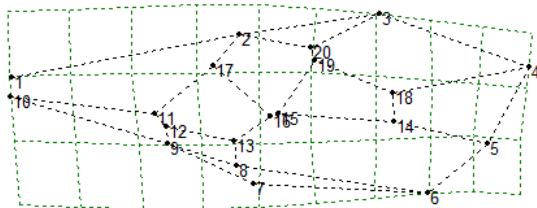
além disso, observa-se a formação de agrupamentos quase distintos entre esses conjuntos populacionais e com os conjuntos populacionais dos estados da região Norte (Figura 17).

A análise dos diagramas de deformação permitiu observar diferenças dentro das populações de *O. bellus* e *Opius* sp. do AP, AM e RN (Figura 17). O primeiro eixo canônico contém 55,1 % da variação entre os grupos relativa à variação dentro dos grupos. Observa-se nesse eixo a separação parcial da população do RN em relação às populações do AM e AP. As populações de *O. bellus* e *Opius* sp. do Norte, como mencionado acima, sobrepõem-se consideravelmente, no eixo negativo da variável canônica 1 (VC1) e no eixo positivo da variável canônica 2 (VC2), enquanto as populações do RN encontram-se no eixo positivo de VC1. Assim, as populações do AM e RN estão ordenadas em um contínuo de variação na forma da asa ao longo do maior eixo de variação (VC1). É importante ressaltar que as deformações hipotéticas ao longo do primeiro e segundo eixo canônico, representam uma possível mudança na forma da asa prevista na variação dos escores dos dois primeiros eixos canônicos. Nos extremos inferior e superior do primeiro eixo canônico (VC1), as principais mudanças da asa estão associadas às nervuras 3RSb (intervalo dos marcos 4 e 18), 3RSa (marcos 18 e 4), 2M (marcos 15 e 14), 3M (marcos 5 e 14), região lateral (marcos 6 e 5), marcos 16 e 15 onde ocorre a intersecção das nervuras (RS+M)a (marcos 17 e 16) e 2RS (marcos 19 e 15), 3CU (marcos 8 e 6), além do deslocamento dos marcos 1, 7 e 11. O resultado indica que as populações de *O. bellus* e *Opius* sp. do AM, localizadas no extremo inferior de VC1 (escore negativo), apresentaram asas ligeiramente mais largas na região dorsal-ventral e mais curtas em relação às demais populações localizadas no extremo superior de VC1 (escore positivo). A maior variação foi observada entre os marcos anatômicos (19 e 18) e (14 e 15) (nervuras 3RSa e 2M respectivamente), ocorreu diminuição desses segmentos resultante da aproximação desses pontos, permitindo o alargamento da região médio-apical da asa. Observa-se uma clara tendência no deslocamento da nervura R1a (marcos 3 e 4) para baixo, fazendo com que o ângulo formado por essa nervura juntamente com a metade posterior do estigma diminua, provocando o deslocamento da região apical da asa para baixo, tornando seu formato nesse eixo positivo, convexo em relação ao formato da asa localizada no eixo negativo de VC1. Os marcos 5 e 6, localizados na margem lateral das asas, tendem a deslocar para baixo. Na base da asa, a deformação causada nessa região é promovida pelo marcos 1 e 11, que igualmente deslocam-se para o centro e para baixo da asa.

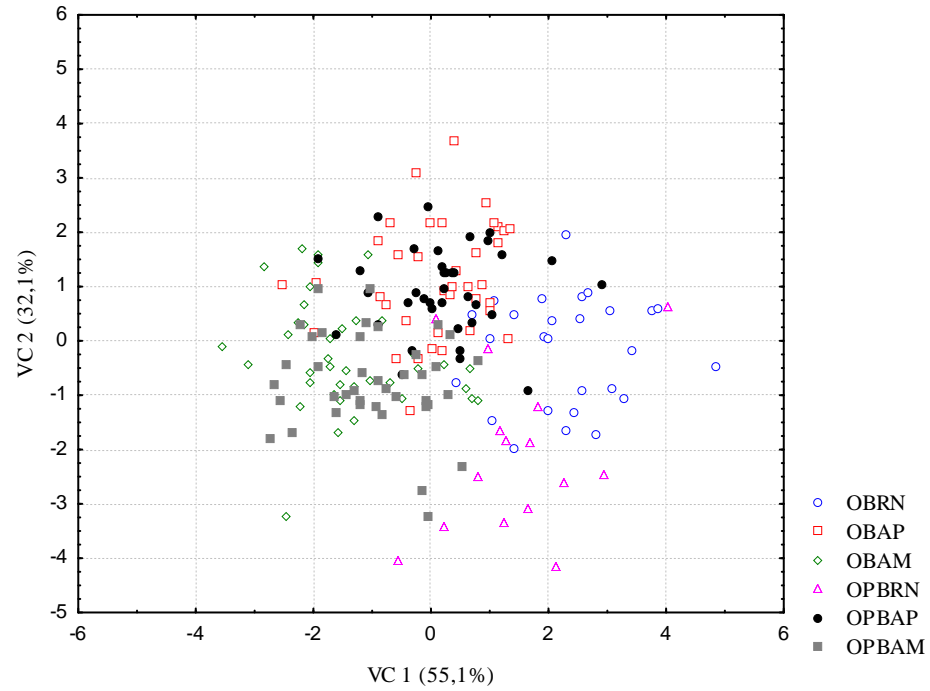
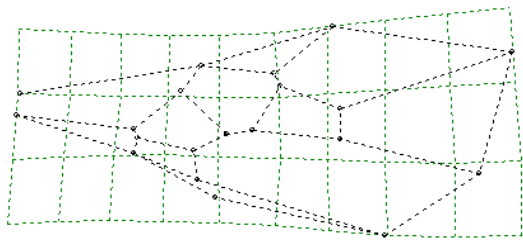
Com o deslocamento do eixo negativo em direção ao eixo positivo de VC1, a população de *O. bellus* e *Opius* sp. do RN formam, nesse eixo, um agrupamento único, ou seja, nesses dois conjuntos populacionais as asas são mais longas e estreitas em sua região dorso-ventral, em virtude do deslocamento de várias nervuras, porém as principais são os alongamentos das nervuras 3RSa (marcos 19 e 18), 2M (marcos 14 e 15) e a aproximação dos marcos 15 e 16 correspondente a nervura (RS+M)b. O estreitamento da asa é resultante do deslocamento para o centro de vários segmentos (marcos 3, 4, 5, 6 e 7), isso promove uma diminuição da região dorso-ventral da asa, por apresentar a região basal e apical voltadas para cima. A asa, em geral, lembra vagamente uma concavidade. É importante observar o deslocamento da nervura (RS+M)a, que corresponde aos marcos 17 e 16, opostas nos extremos inferior e superior de VC1.

No segundo eixo canônico (VC2), a variação foi de 32,1%. Observa-se que ao longo do eixo positivo, as populações sobrepostas de *O. bellus* e *Opius* sp. do AP encontram-se agrupadas no extremo superior do eixo VC2. Esse conjunto apresenta asas com formato relacionado a esse eixo, diferente do encontrado em VC1, onde não foi possível ser visualizado. A asa é alongada, porém, apresenta uma forte compressão na região médio-apical, em relação à base. É possível, observar mudanças conspícuas nessa região resultante do deslocamento de vários marcos. As principais mudanças que contribuem para esse formato estão associadas às nervuras 3RSa (marcos 19 e 18), 3RSb (marcos 18 e 4), 2M (marcos 15 e 14), 3M (marcos 14 e 5), 3CU (marcos 6 e 8), (RS+M)b (marcos 15 e 16) e 2RS (marcos 19 e 15). Observa-se o alongamento das nervuras 3RSa e 2M e a compressão das nervuras 3RSb, 3M e R1a, gerando uma compressão localizada, diminuindo a largura da região lateral, portanto, a asa apresenta-se mais estreita próximo ao ápice. É importante atentar para aproximação dos marcos 15 e 16, onde se encontra a nervura (RS+M)b. Na identificação dessas espécies, a nervura 1m-cu (marcos 13 e 16) alcança a primeira célula subdiscal 1st (Figura 17), quando se passa uma linha imaginária nesta nervura, porém os marcos 15 e 16 estão bastante aproximados, de modo que a nervura passa em linha reta a nervura 2RS. A segunda célula submarginal (2nd) não apresentou grande modificação, exceto pela população do AM, onde a célula foi mais curta devido ao encurtamento dos segmentos 3RSa (marcos 19 e 18) e 2M (marcos 14 e 15) e mais larga pelo alongamento dos segmentos 2RS (marcos 15 e 19) e r-m (marcos 14 e 18).

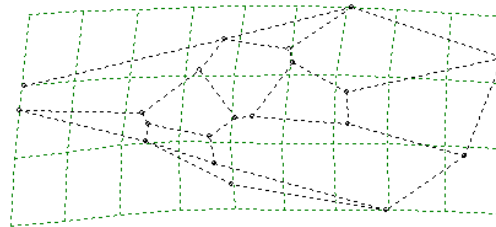
VC2 extremo superior



VC2 extremo inferior



VC1 extremo inferior



VC1 extremo superior

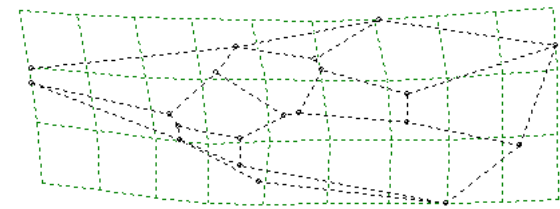


Figura 17 – Gráfico de dispersão para fêmeas e machos de *Opius bellus* e *Opius* sp. do AP, AM, RN no espaço bidimensional das variáveis canônicas VC1 e VC2 geradas após análise de coordenadas posicionais em plano cartesiano de 20 pontos anatômicos da asa. Os diagramas de deformações ao redor do gráfico indicam as conformações alares presumíveis para indivíduos situados no extremo superior e inferior das variáveis canônicas. As magnitudes das deformações foram aumentadas em 3X para visualização

4.3.2.2 Análise de agrupamento

Os valores das distâncias de Mahalanobis (Tabela 5), calculados a partir dos componentes de forma das populações de machos e fêmeas de *O. bellus* e *Opius* sp. foram utilizadas nas análises de *cluster* (UPGMA), que gerou o dendograma (Figura 18). Foi possível visualizar a formação de dois agrupamentos, nos quais estão as populações de *O. bellus* e *Opius* sp. do AP e AM, que se separam das populações de *O. bellus* e *Opius* sp. do RN. De acordo com a análise das distâncias de Mahalanobis, as populações da região Norte demonstraram ter maior grau de semelhança, em relação à população do RN. Porém, apesar da formação desses agrupamentos, verifica-se que os espécimes de *O. bellus* Gahan e *Opius* sp. são semelhantes morfologicamente nos três estados e a separação desses agrupamentos por localidade indica que esses espécimes são, de fato, similares podendo pertencer à mesma espécie. A maior distância de Mahalanobis foi encontrada entre *O. bellus* (AM) - *O. bellus* (RN) 14,29%, seguido de, *O. bellus* (AM) - *Opius* sp. (RN) 13,41%, *O. bellus* (AP) - *Opius* sp. (RN) 12,84%, *O. bellus* (RN) - *Opius* sp. (AM) 11,87% e *Opius* sp. (RN) – *Opius* sp. (AP) 11,53%. Portanto, há uma margem de distância relativamente alta entre a população do RN em relação às populações do AM e AP (Tabela 5).

Tabela 5 - Distâncias de Mahalanobis de fêmeas e machos de *Opius bellus* e *Opius* sp. do RN, AM, AP, calculada a partir dos componentes de forma das asas

Espécies	OBRN	OBAP	OBAM	OPBRN	OPBAP	OPBAM
OBRN	0.00					
OBAP	7.93	0.00				
OBAM	14.29	5.00	0.00			
OPBRN	7.74	12.84	13.41	0.00		
OPBAP	6.80	0.55	4.71	11.53	0.00	
OPBAM	11.87	5.27	1.19	9.59	4.67	0.00

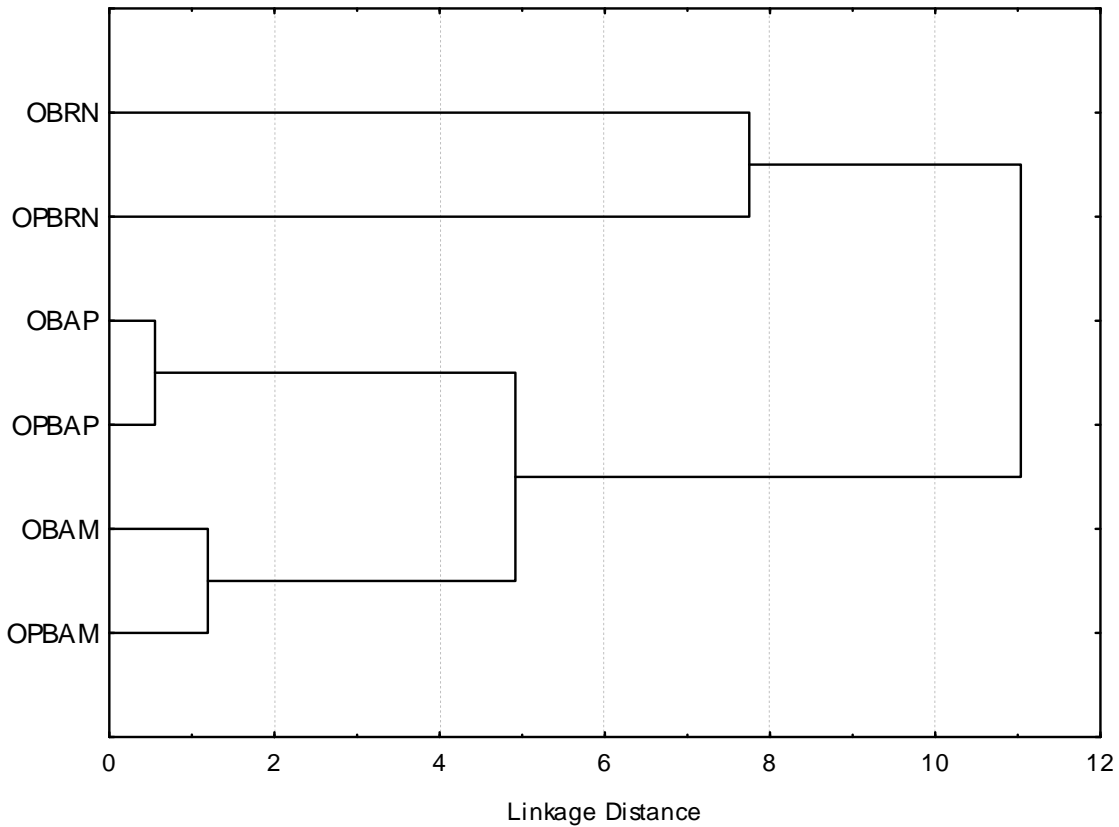


Figura 18 - Dendrograma para fêmeas e machos de *Opius bellus* e *Opius* sp. do RN, AM, AP gerados por análise de cluster (UPGMA) a partir de distâncias de Mahalanobis apresentadas na Tabela 5

4.3.2.3 Considerações geográficas

O agrupamento por origem geográfica, visualizada entre as populações de *Opius bellus* e *Opius* sp. indica a existência de fatores intrínsecos, que podem estar atuando em cada localidade, contribuindo para a separação de populações próximas. Mais uma vez a obtenção das amostras populacionais dos parasitóides, provavelmente, seja um dos fatores que possam ter influenciado nos resultados (ver discussão no item 4.3.1.3). A coleta das amostras não foi regular, tendo sido realizada apenas quando os frutos estavam disponíveis, em qualquer época do ano, não tendo havido preocupação quanto a associação com a larva hospedeira, ou fruto coletado, fatores essenciais para determinar diferenças entre grupos. Porém, é importante inferir sobre a origem dessas populações. O agrupamento, por estado, revela a existência de processos microevolutivos em cada localidade, principalmente quando são analisadas as populações da região Norte do

Brasil. Esta região apresenta um ambiente bastante complexo, em virtude das diferenças em seu relevo (Igapós, Várzeas e Baixos Platôs), ou seja, presença de planícies e planaltos que abrangem desde terras inundáveis até picos acima de 3.000 m de altitude. O clima é predominantemente Equatorial, com temperaturas anuais elevadas, sendo algumas regiões mais frias ou quentes, dependendo da latitude local, com UR que pode chegar a 80%. A região apresenta extensa vegetação densa de aspecto variado, conforme a proximidade dos rios (Floresta Amazônica) e é considerada uma das regiões menos populosas do Brasil. Este fator deve ser destacado, pois essa pequena densidade populacional faz com que a região Norte apresente os chamados “vazios demográficos”, em virtude da grande extensão de área coberta da Floresta Amazônica, que por ser um ecossistema denso, não permite com facilidade que haja a ocupação humana, concentrando as populações nas capitais dos estados (http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Regi%C3%A3oNorte_do_Brasil&oldid=13060744). Wallace (1852) explicou pela primeira vez os padrões de distribuição da subregião Amazônica e considerou que os rios da bacia Amazônica atuavam como barreiras à dispersão. A descrição da biogeografia da subregião Amazônica pode ser encontrada em MORRONE (2006).

Não foi possível determinar a distância de coleta entre os estados do Amazonas e Amapá, porém é importante ressaltar que essas populações, visualmente separadas, estão sofrendo a influência de fatores não possíveis de serem medidos neste estudo. Já foi constatado que as peculiaridades de uma determinada região ou local criam habitats diferenciados, em razão da interação, no mesmo espaço, de fatores bióticos e abióticos. Essas estruturas ambientais possuem características próprias criando um ambiente rico em diversidade, assim, diferentes fenótipos podem apresentar diferentes níveis de tolerância para vários eixos do nicho, portanto, o nicho ecológico pode evoluir, e na realidade, frequentemente variar entre diferentes populações geográficas de uma espécie (FUTUYMA, 1992). Dentro e entre as populações, as características morfométricas são geneticamente variáveis e muito sensíveis às condições ambientais (GIBERT et al., 2004). Assim, pode-se considerar que a redução no fluxo gênico das populações do AM e AP, esteja ocorrendo em razão da distância de origem dos indivíduos coletados, servindo como uma possível barreira geográfica entre essas populações alopátricas (SELIVON, 2000). Apesar de ter sido constatada proximidade entre *O. bellus* e *Opius* sp., no gráfico de dispersão da população do RN, percebe-se uma pequena divergência entre as populações nesse estado, provavelmente em razão do habitat em que vivem. O método utilizado, além de ter proporcionado o esclarecimento

da proximidade de espécies relacionadas, por meio da análise da forma das asas, permitiu visualizar o comportamento das populações frente à ação ambiental. Assim, este estudo serve como ponto de partida para a análise dos fatores atuantes nessas populações. Segundo Marrone (2004), a compreensão da dimensão espacial dos seres vivos, a partir da análise de suas distribuições geográficas é um pré-requisito para estudos evolutivos, visto que a geografia é o substrato sobre o qual ocorre a história da vida.

4.3.2.4 Dimorfismo sexual

O grau de dimorfismo sexual de *O. bellus* e *Opius* sp. foi analisado nas asas com base no tamanho do centróide, a partir dos gráficos das médias e desvios-padrões (intervalo de confiança a 95%). O resultado aponta a existência de dimorfismo sexual nessas “espécies”. As fêmeas apresentam asas relativamente maiores que os machos, resultado semelhante ao encontrado nas espécies de *Doryctobracon*. Esse resultado ainda aponta a semelhança, com relação ao tamanho da asa, entre *O. bellus* e *Opius* sp. nos estados do AM e AP (Figura 19). Nos testes para detecção de dimorfismo sexual relacionado ao tamanho do centróide, os exemplares de *Opius* sp. do RN foram excluídos das análises por causa da limitação do número de indivíduos.

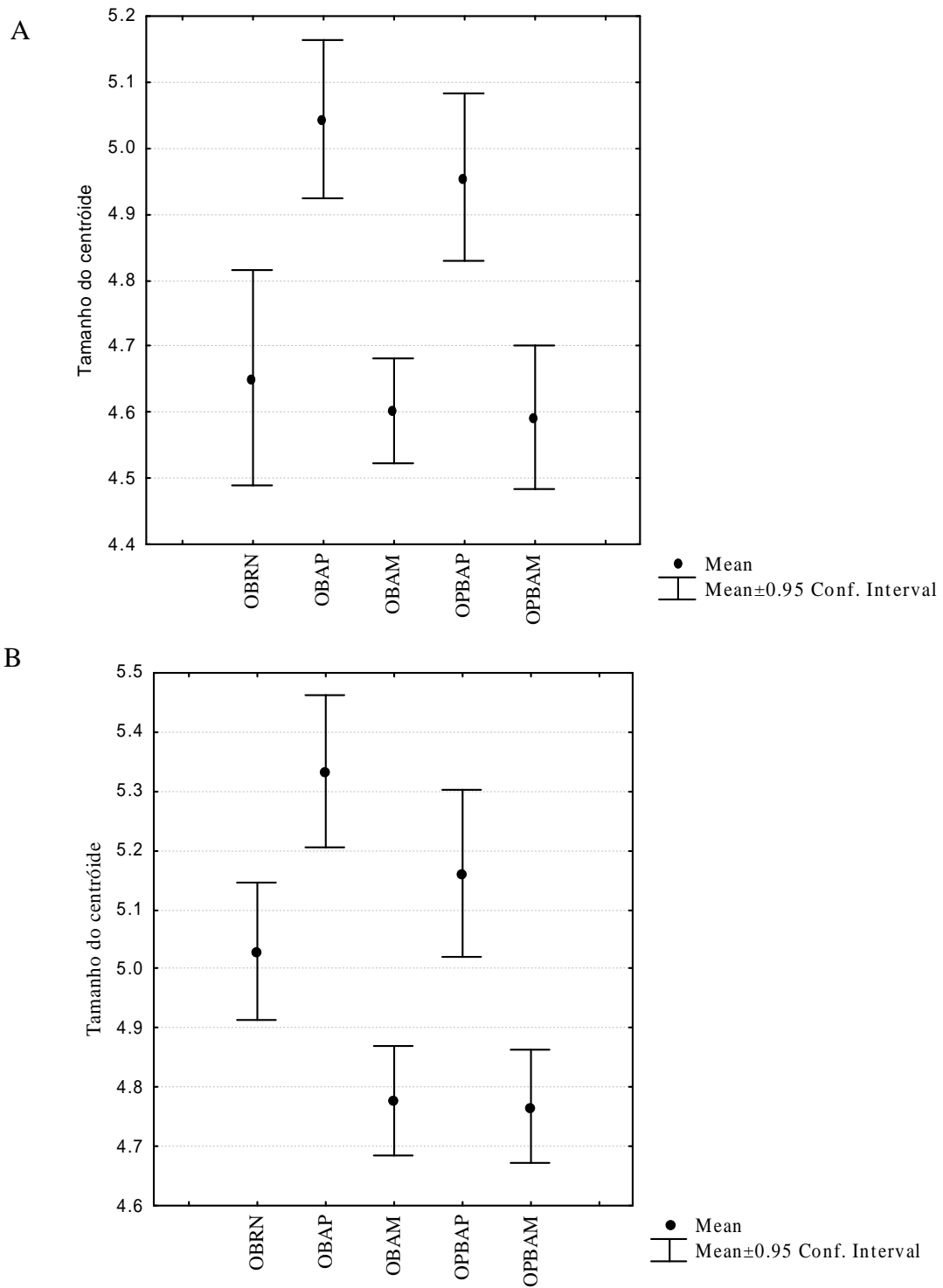


Figura 19 - Médias e desvios-padrão dos tamanhos dos centróides calculados a partir das asas de machos (A) e fêmeas (B) de *Opius bellus* e *Opius* sp. coletados no RN, AM e AP

4.4 Análises moleculares

O DNA genômico, para o sequenciamento de porções de dois marcadores moleculares selecionados (ITS2 e 28S rDNA D2) dos braconídeos, foi obtido a partir de extrações individuais do abdome desses insetos. Foram obtidas 23 sequências para a região do ITS2 (8 para as espécies de *Doryctobracon* e 15 para as de *Opius*) e 23 para a região do 28S rDNA D2 (8 para as espécies de *Doryctobracon* e 15 para as de *Opius*) (Tabelas 6 e 9).

4.4.1 *Doryctobracon*

As populações de *D. areolatus* foram selecionadas com base em sua origem geográfica, onde foram coletadas as espécies *Doryctobracon* sp. 1 (estigma claro) (AP) e *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro) (AP, TO, GO). A proximidade geográfica foi levada em consideração para a determinação de proximidade genética intra e interespecífica. A população de *D. areolatus* de SP foi incluída a título de comparação, já que nessa localidade ocorre essa espécie exclusivamente.

As sequências obtidas do ITS2 apresentaram alta qualidade em todas as amostras, sendo o produto de amplificação variável de 564pb a 590pb. O resultado demonstrou a ocorrência de variabilidade intraespecífica com relação ao tamanho do fragmento ITS2, de acordo com a origem geográfica, para as populações de *D. areolatus* (AP - 564pb; SP - 590pb; GO e TO - 587pb), mas apesar dessa variação, a composição das sequências foi similar para a maioria delas, exceto para *D. areolatus* do AP, onde ocorreu deleção de 26pb. Entretanto, com relação aos demais espécimes analisados, essa região foi bastante uniforme não se mostrando variável quanto ao tamanho (*Doryctobracon* sp. 1: AP - 585pb; *Doryctobracon* sp. 2: AP, TO e GO - 567pb), mas na composição de seus nucleotídeos. Assim, *Doryctobracon* sp. 1 e *Doryctobracon* sp. 2, além de apresentarem tamanhos de ITS2 distintos, apresentaram também variação significativa na composição das sequências desse marcador molecular, inclusive em relação a *D. areolatus* (Tabela 6, anexo).

As sequências obtidas do 28S rDNA D2 variaram de 381pb a 387pb, sendo identificada variabilidade intraespecífica no tamanho do fragmento dependendo da origem geográfica das populações de *D. areolatus* (AP – 381pb; GO – 386pb; TO – 384pb; SP – 385pb). Porém, apesar dessa variação, a composição das sequências das populações dessa espécie foi significativamente

semelhante. A região 28S rDNA D2 não se mostrou variável com relação ao tamanho do fragmento para os demais espécimes (*Doryctobracon* sp. 1, AP – 385pb; *Doryctobracon* sp. 2, AP e TO – 386pb; GO – 387pb) (Tabela 6). A utilização de ambos marcadores moleculares evidenciou a ocorrência de variabilidade intrapopulacional para o tamanho e composição das sequências obtidas para a região do 28S rDNA D2, em relação ao marcador ITS2 nas populações de *D. areolatus*, mas independentemente das variações encontradas a similaridade dessas sequências é bastante elevada. Em *Doryctobracon* sp. 2, a similaridade entre o tamanho e composição das sequências para ambos marcadores também foi alta (Tabela 6 e anexo).

Tabela 6 – Tamanho do fragmento dos marcadores ITS2/28SD2 para as espécies de *Doryctobracon*

Códigos	Marcadores	Tamanho	Espécies	Estigma	Sexos	Estados	GenBank (acesso)
DCAP	ITS2/28SD2	585pb/385pb	<i>Doryctobracon</i> sp.1	claro	macho	AM	FJ560534 - FJ560542
DEAP	ITS2/28SD2	567pb/386pb	<i>Doryctobracon</i> sp.2	escuro	macho	AP	FJ560535 - FJ560543
DETO	ITS2/28SD2	567pb/386pb	<i>Doryctobracon</i> sp.2	escuro	macho	TO	FJ560536 - FJ560544
DEGO	ITS2/28SD2	567pb/387pb	<i>Doryctobracon</i> sp.2	escuro	macho	GO	FJ560537 - FJ560545
DAAP	ITS2/28SD2	564pb/381pb	<i>D. areolatus</i>	escuro	fêmea	AM	FJ560538 - FJ560546
DAGO	ITS2/28SD2	587pb/ 386pb	<i>D. areolatus</i>	escuro	fêmea	GO	FJ560539- FJ560547
DATO	ITS2/28SD2	587pb/384pb	<i>D. areolatus</i>	escuro	fêmea	TO	FJ560540 - FJ560548
DASP	ITS2/28SD2	590pb/385pb	<i>D. areolatus</i>	escuro	fêmea	SP	FJ560541 – FJ560549

As populações apresentaram sequências de uso de nucleotídeos semelhantes na composição dos códons para o gene ITS2 e 28S rDNA D2. Em ITS2, os nucleotídeos timina e adenina foram os mais abundantes, correspondendo a cerca de 36,0 - 34,8% e 34,9 - 34,2% da composição total de nucleotídeos, enquanto citosina e guanina representaram cerca de 14,5 - 13,2% e 16,8 - 14,8% dos nucleotídeos analisados, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados para fragmento 28S rDNA D2, onde a composição nucleotídica também foi semelhante. Timina e adenina foram mais abundantes, correspondendo a 36,6 - 35,9% e 25,1 - 26,0%, enquanto citosina e guanina representaram 17,4 - 16,8% e 21,4 - 20,7% da composição

nucleotídica total. O conteúdo G+C das sequências analisadas para 28S rDNA D2 e ITS2, ocorreu numa média de 38,2% e 29,7%, respectivamente (Tabela 7). O conteúdo G+C é definido como a porcentagem média das guaninas e citosinas nas sequências de DNA e seus valores diferem amplamente entre organismos (NAHUM, 2001). A importância da análise do conteúdo G+C está vinculada às análises filogenéticas, uma vez que a região GC possui maior estabilidade, por apresentar três pontes de hidrogênio produzindo estruturas secundárias mais estáveis (TORRES; MATOSO; ARTONI, 2004). Neste trabalho, foi possível verificar por meio dos cladogramas, maior variabilidade para o marcador ITS2, que 28S rDNA D2. Os resultados corroboram com a porcentagem encontrada entre o ITS2 e 28S rDNA D2, onde foi possível verificar a maior porcentagem do conteúdo G+C em 28S rDNA D2 (38,2%), indicando que este marcador apresenta uma região mais conservada em relação ao ITS2 (29,7%). Nas análises filogenéticas realizadas em populações de *Spalangia* (Hymenoptera: Pteromalidae), a região D2 do gene ribossomal 28S foi mais conservada em relação a ITS1 (TAYLOR et al., 2006).

Tabela 7 – Composição nucleotídica, tamanho e conteúdo G+C (guanina + citosina) para as sequências obtidas pelo ITS2 e 28S rDNA D2 de *D. areolatus* (AP, GO, TO, SP), *Doryctobracon* sp. 1 (AP) e *Doryctobracon* sp. 2 (AP, GO, TO)

Amostras	ITS2						28S rDNA D2					
	Tamanhos (pb)	Conteúdos G+C (%)	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	Tamanhos (pb)	Conteúdos G+C (%)	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)
DCAP	585	29,6	35,7	13,2	34,7	16,4	385	38,1	36,6	17,1	25,2	21,0
DEAP	567	29,3	35,8	14,1	34,9	15,2	386	38,9	36,3	17,4	24,9	21,5
DEGO	567	29,6	35,4	14,3	34,9	15,3	386	38,7	36,2	17,3	25,1	21,4
DETO	567	29,4	36,0	14,1	34,6	15,3	387	38,6	36,3	17,4	25,1	21,2
DAAP	564	30,8	34,9	14,0	34,2	16,8	381	37,5	36,5	16,8	26,0	20,7
DAGO	587	30,0	35,1	14,3	34,9	15,7	386	38,1	36,3	17,4	25,6	20,7
DATO	590	30,2	34,8	14,5	34,9	15,8	384	38,0	35,9	17,2	26,0	20,8
DASP	587	28,9	35,3	14,1	34,8	14,8	385	38,4	36,1	17,4	25,5	21,0

As análises de agrupamento indicaram que há divergência genética entre *D. areolatus*, *Doryctobracon* sp. 1 e *Doryctobracon* sp. 2. Os cladogramas produzidos para ambos marcadores moleculares, ITS2 e 28S rDNA D2, mostraram o mesmo posicionamento nos agrupamentos construídos para os indivíduos coespecíficos provenientes de localidades geográficas distintas (Figura 20). Em *D. areolatus*, houve a formação de um agrupamento distinto dos demais espécimes analisados em ambos marcadores, ITS2 e 28S rDNA D2. No cladograma construído para o ITS2, observa-se que as populações de *D. areolatus* de GO, TO, SP e AP estão dispostas em um agrupamento comum, ficando a população do AP em um ramo mais distante, sendo a mais distinta dessa espécie. Com relação às populações de *Doryctobracon* sp. 1 e *Doryctobracon* sp. 2, também observa-se divergência genética entre os espécimes analisados (Figura 20). Os clados representados por esses indivíduos destacam-se pelo elevado suporte em suas análises com valores de *bootstrap* de 100% na formação desse agrupamento. Foi possível verificar a formação de um clado bem definido para *Doryctobracon* sp. 2 nas três regiões investigadas (GO, AP e TO). *Doryctobracon* sp. 1 formou um clado separado dos demais espécimes, próximo a população de *D. areolatus* do AP; porém, como já foi mencionado, a composição de nucleotídeos é distinta, apresentando distância genética bastante significativa entre os indivíduos analisados (Figura 20, Tabela 8 e anexo). Todos os ramos formados apresentam valores de *bootstrap* superiores a 50%, indicando um elevado suporte para formação dos agrupamentos. No entanto, por meio das análises de agrupamento realizadas para o marcador molecular 28S rDNA D2, entre as populações de *D. areolatus*, os espécimes originados do AP e GO, apresentaram baixo suporte para a formação desse ramo, que se apresentou inferior a 50% (26% de divergência), não sustentando o ramo formado, entretanto, as populações dessa espécie oriundas do TO e SP apresentaram maior proximidade, com suporte de 80%. Porém, semelhante às análises do marcador ITS2, *Doryctobracon* sp. 1 e *Doryctobracon* sp. 2 formaram agrupamentos distintos, apresentando ramos com *bootstrap* superior a 50%, indicando, de fato, a distinção entre as espécies de estigma claro e estigma escuro daquela de *D. areolatus*. *D. crawfordi* Viereck (número de acesso no NCBI Z93646.1) foi incluída nessa análise como grupo externo saindo em um ramo separado às demais espécies analisadas (Figura 20).

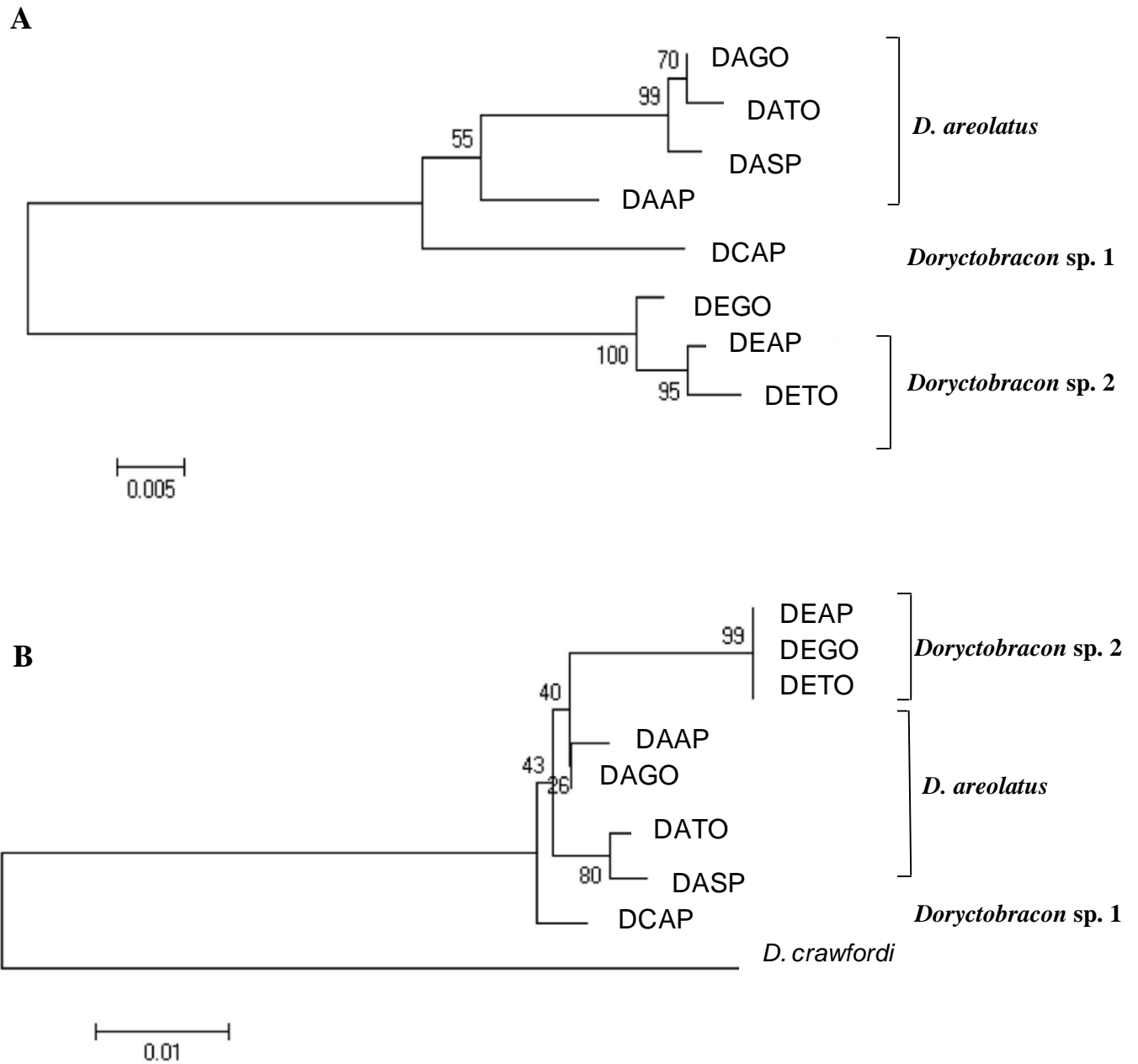


Figura 20 - Árvores linearizadas de Neighbour-Joining (NJ) de *Doryctobracon* sp. 1 (AP), *Doryctobracon* sp. 2 (AP, GO, TO) e *D. areolatus* (AP, GO, TO, SP), produzidas a partir da análise de sequências de nucleotídeos (A) porção ITS2 e (B) porção 28S rDNA D2

Os resultados das análises de similaridade calculados para os diferentes espécimes de *Doryctobracon* apoiam os cladogramas obtidos (Figura 20). Na matriz de similaridade, foi possível determinar a proximidade genética dos espécimes investigados em ambos marcadores moleculares ITS2 e 28S rDNA D2 (Tabela 8). É possível observar um elevado grau de proximidade para a região do ITS2 (99%) entre diferentes populações de *D. areolatus* (TO, GO, SP), sendo a população do AP a menos similar (88%), além de ser mais semelhante àquela de *Doryctobracon* sp. 1 do AP (91%). Em relação a *Doryctobracon* sp. 2, as análises de ambos marcadores revelaram elevada proximidade genética entre os indivíduos dessa espécie nas três localidades geográficas (99%), indicando de fato serem coespecíficos.

Tabela 8 - Matriz de similaridade genética da porção ITS2 (diagonal superior) e 28S rDNA D2 (diagonal inferior) das populações *D. areolatus* (AP, GO, TO, SP), *Doryctobracon* sp. 1 (AP) e *Doryctobracon* sp. 2 (AP, GO, TO)

Amostras	DAGO	DATO	DASP	DAAP	DCAP	DEAP	DETO	DEGO
DAGO	-	0,99	0,99	0,88	0,85	0,78	0,78	0,78
DATO	0,98	-	0,98	0,88	0,85	0,77	0,77	0,78
DASP	0,98	0,98	-	0,88	0,85	0,78	0,77	0,78
DAAP	0,98	0,98	0,97	-	0,91	0,80	0,80	0,81
DCAP	0,98	0,97	0,98	0,98	-	0,82	0,82	0,82
DEAP	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96	-	0,99	0,99
DETO	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96	0,99	-	0,98
DEGO	0,97	0,96	0,96	0,96	0,97	0,99	0,99	-
<i>D. crawfordi</i>	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87	0,85	0,85	0,86

A utilização dos marcadores moleculares ITS2 e 28S rDNA D2 possibilitou a confirmação de divergência entre *D. areolatus*, *Doryctobracon* sp. 1 e *Doryctobracon* sp. 2. Nesse contexto, ainda ficou evidente a ocorrência de variabilidade intraespecífica das populações de *D. areolatus* das distintas localidades geográficas (AP, TO, GO e SP), que também se confirmou por meio das análises morfométricas da asa anterior (item 4.5). A existência de

variabilidade entre indivíduos da mesma espécie, oriundas de diversas localidades geográficas, como comentado, está ligada às variações ambientais de cada habitat. As interações entre fatores bióticos e abióticos criam estruturas ambientais, formando padrões geográficos em diversidade de espécies. *D. areolatus* certamente sofre influência de modificações ambientais localizadas em seu habitat de origem e, devido à essa diferenciação, seus nichos certamente variam em virtude da espécie hospedeira e do tipo de fruto existente no local. Esse fato pode explicar a maior divergência encontrada para a espécie *D. areolatus* do AP em relação às populações das outras áreas geográficas. O estado do AP está incluído em uma área de Floresta Amazônica, com grande biodiversidade animal e vegetal e interações entre fatores bióticos e abióticos bastante complexos. Essas diferenças, também foram constatadas nas estruturas de suas asas e também podem ser observadas na coloração geral dos espécimes. Variações de coloração dos lobos mesotonais dos machos de *D. areolatus*, foram registradas previamente por Blanchard (1966) e Ovruski (2003). Esse autor ainda observou que 15% das fêmeas apresentaram manchas transversais castanho-escuras, a partir do segundo e quarto tergitos metassomais, enquanto vários machos apresentaram uma mancha escura sobre os três últimos tergitos. Segundo Futuyma (1992), cada genótipo é um tanto variável fenotipicamente, pois o seu desenvolvimento é diretamente afetado pelo ambiente e por eventos aleatórios durante a ontogenia. Assim, devido aos fenótipos apresentarem diferentes limites de tolerância a vários eixos do nicho, o nicho ecológico, pode evoluir e, na realidade, frequentemente variará entre as diferentes populações geográficas de uma espécie. Os genes exprimem seus efeitos no fenótipo via reações bioquímicas, porém não sozinhos. Seus efeitos dependem do meio químico e físico em que as reações ocorrem, assim o ambiente externo afeta a expressão fenotípica. Diferentes genes têm sido utilizados para avaliar a divergência genética de espécies relacionadas ou populações de insetos (CATERINO; CHO; SPERLING, 2000). O DNA ribossomal (DNAr) é amplamente utilizado na identificação de espécies, apresentando componentes em sua sequências que envolvem variações e servem aos estudos de sistemática para diferentes níveis taxonômicos (FOULY; WILKINSON; CHEN, 1997; WEEKERS; DE JONCKHEERE; DUMONT, 2001). As regiões espaçadoras ITS acumulam variabilidade, sendo utilizadas na diferenciação de espécies ou linhagens da mesma espécie. Já as regiões 18S e 28S rDNA são bastante conservadas e podem ser utilizadas para diferenciação em nível de gênero e espécie (BERBEE; TAYLOR, 1995; GARGAS; DEPRIEST, 1996; RISTAINO et al., 1998; ESTEVE-ZARZOSO et al., 1999). Silva

et al. (1999), a partir do sequenciamento da região ITS2 e marcadores enzimáticos, separaram cinco populações de *Trichogramma* de Portugal pelo comprimento de cada fragmento, com auxílio de enzimas de restrição. Ciciola Júnior (2000) confirmou a ocorrência de *Trichogramma lasallei* Pinto no Brasil, espécie morfológicamente semelhante a *T. rojasi* Nagajara & Nagarkatti, a partir da análise da região ITS2. Os espaçadores ITS1 e ITS2 foram utilizados para determinar a proximidade das espécies morfológicamente indistintas, *Tomicus destruens* (Wollaston) e *T. piniperda* (Linnaeus), sendo encontradas diferenças no comprimento da região ITS1 de 100pb e similaridade no tamanho do espaçador ITS2, com diferenças consistentes, sendo observadas nas sequências de ambos marcadores moleculares nas diferentes populações analisadas (GALLEGO; GÁLIAN, 2001). As relações filogenéticas da família Braconidae, envolvendo 88 grupos taxonômicos e 35 subfamílias foram investigadas utilizando sequências homólogas do segmento D2 da região do 28S rDNA, além das regiões 16S rDNA, 18S rDNA e dados morfológicos. A natureza monofilética de todos os múltiplos representantes foi bem sustentada, exceto pelas subfamílias Cenocoelinae e Neoneurinae, que provavelmente devem ser tratadas como tribo da subfamília Euphorinae (SHI; CHEN; VAN ACHTERBERG, 2005). A região do D2 do 28S rDNA também foi utilizada na primeira reconstrução filogenética da superfamília Ichneumonoidea (BELSHAW et al., 1998). A similaridade genética de seis espécies de *Spalangia* (Hymenoptera: Pteromalidae) foram examinadas por meio do uso das regiões ribossomais ITS1 e os segmentos D2-D3 do gene 28S. Não foi possível fazer nenhum diagnóstico quanto às espécies com o uso do marcador ITS1 devido ao alto número de inserções/deleções. No entanto, a região D2-D3 do gene ribossomal 28S possibilitou a análise filogenética de *Spalangia* spp. (TAYLOR et al., 2006). Esse autor ainda afirmou que a região D2-D3 do gene ribossomal 28S, além do 18S, fornece um método alternativo da análise filogenética, que pode ser igualmente utilizado para testar ou suplementar as hipóteses derivadas da morfologia.

4.4.2 *Opius*

O tamanho do fragmento amplificado para ITS2 dos espécimes *Opius bellus* e *Opius* sp. variou de 658pb a 669pb (Tabela 9). As análises das sequências do ITS2, obtidas para os indivíduos de todas as populações analisadas, indica haver variabilidade intrapopulacional semelhante à interpopulacional para o tamanho e composição das sequências obtidas, com elevada similaridade entre as morfoespécies analisadas (Tabela 9 e anexo). A variação intraespecífica encontrada na região do ITS2 para as morfoespécies analisadas foi tão elevada quanto a variação encontrada entre indivíduos de morfoespécies distintas. Essa variação refere-se tanto ao tamanho do fragmento, quanto à sua composição. Independentemente das variações encontradas, a similaridade entre as sequências é bastante elevada e as regiões onde variações mais frequentes foram encontradas ocorreram indistintamente nas duas morfoespécies analisadas. Pelo fato de serem encontradas variações intraespecíficas, que dificultou este recurso na definição taxonômica e pela indisponibilidade de sequências com este marcador para outras espécies do gênero, foi utilizado o segmento de expansão D2 da região do 28S rDNA. Nesse caso, foi possível o alinhamento das sequências obtidas com sequências disponíveis no NCBI.

Em todas as amostras obtidas do 28S rDNA D2, o tamanho dos fragmentos para os indivíduos analisados foi de 428pb, com elevada similaridade nucleotídica, com exceção de dois espécimes, *Opius* sp. (AP) e *Opius bellus* (RS), respectivamente (7AAPF1 e 13CRSF2), que diferiram em uma única base na posição 300 (ver anexo). Apesar de ter ocorrido variabilidade dentro das populações de *Opius bellus* e *Opius* sp., os resultados demonstraram alta similaridade entre as sequências genômicas, indicando que os indivíduos são coespecíficos.

Variações intra e interindividuais no comprimento e na sequência do ITS2 têm sido constatadas em estudos filogenéticos (RICH et al., 1997; ONYABE; CONN, 1999; HUGALL et al., 1999). Tais variações intragenômicas poderiam conduzir ao desenvolvimento de filogenias errôneas se as variações intra e interindividuais da mesma população diferissem tanto quanto entre populações e espécies (RICH et al., 1997). Alguns estudos avaliam apenas a sequência de um clone por espécie para a região do ITS, pois alguns autores assumem baixa diversidade intragenômica e interpopulacional dentro das espécies (FENTON et al., 1994; McLAIN et al., 1995; MYLLYS et al., 1999; XU; QU, 1997). Isto está baseado na premissa de que a repetição de famílias multigênicas são homogeneizadas por um processo conhecido por evolução em concerto

(ZIMMER et al., 1980), considerada como norma para muitos organismos (BROWN; WENSINK; JORDAN, 1972; HILLIS; DAVIS, 1988). Assim, alguns estudos têm sido conduzidos para verificar possíveis variações, com o objetivo de investigar se o nível de variação genômica intra e interindividual na região do ITS2. Em *Ageniaspis citricola* Logvinovskaya (Hymenoptera: Encyrtidae), a região ribossomal ITS2 foi utilizada para separar populações provenientes de diferentes áreas geográficas da Austrália e Taiwan. Para comparação com esses indivíduos, clones individuais de *A. fuscicollis* Dalman (espécie restrita à Europa), foi utilizada como grupo externo. Foram observadas variações intra e interindividuais no comprimento e sequência da região do ITS2 para as populações de *Ageniaspis*, observando que a variação intraindividual, por vezes, foi maior que entre indivíduos. Esse resultado sugeriu que a evolução em concerto não foi homogênea em todas as cópias individuais do rDNA dentro dos indivíduos, no entanto, a variação encontrada na região do ITS2 não prejudicou as análises filogenéticas, sendo estas informativas para a definição das três populações estudadas, ou seja, *A. citricola* Logvinovskaya da Austrália e de Taiwan e de *A. fuscicollis* Dalman, sugerindo ainda que as populações de *A. citricola* Logvinovskaya australianas e taiwaneses são espécies crípticas (ALVAREZ; HOY, 2002).

Tabela 9 – Tamanho do fragmento dos marcadores em *Opius bellus* e *Opius* sp.: A - tibia clara/antena clara, B - tibia clara/antena escura, C - tibia escura/antena escura e D - tibia escura/antena clara

Códigos	Marcadores	Tamanhos	“Espécies”	Tibia/antena)	Sexos	Estados	GenBank (acesso)
1AAMM1	ITS2/28SD2	661pb/428pb	<i>Opius</i> sp.	clara/clara	macho	AM	FJ560519 - FJ560504
2BAMM2	ITS2/28SD2	661pb/428pb	<i>Opius</i> sp.	clara/escura	macho	AM	FJ560520 - FJ560505
3CAMM3	ITS2/28SD2	666pb/428pb	<i>Opius bellus</i>	escura/escura	macho	AM	FJ560521 - FJ560506
4AAMF1	ITS2/28SD2	662pb/428pb	<i>Opius</i> sp	clara/clara	fêmea	AM	FJ560522 - FJ560507
5DAMF2	ITS2/28SD2	661pb/428pb	<i>Opius bellus</i>	escura/clara	fêmea	AM	FJ560523 - FJ560508
6AAPM1	ITS2/28SD2	665pb/428pb	<i>Opius</i> sp.	clara/clara	macho	AP	FJ560524 - FJ560509
7AAPF1	ITS2/28SD2	659pb/428pb	<i>Opius</i> sp.	clara/clara	fêmea	AP	FJ560525 - FJ560510
8ARNF1	ITS2/28SD2	659pb/428pb	<i>Opius</i> sp.	clara/clara	fêmea	RN	FJ560526 - FJ560511
9DRNF2	ITS2/28SD2	663pb/428pb	<i>O. bellus</i>	escura/clara	fêmea	RN	FJ560527 - FJ560512
10DRJF1	ITS2/28SD2	663pb/428pb	<i>O. bellus</i>	escura/clara	fêmea	RJ	FJ560528 - FJ560513
11DTOF1	ITS2/28SD2	658pb/428pb	<i>O. bellus</i>	escura/clara	fêmea	TO	FJ560529 - FJ560514
12DRSF1	ITS2/28SD2	663pb/428pb	<i>O. bellus</i>	escura/clara	fêmea	RS	FJ560530 - FJ560515
13CRSF2	ITS2/28SD2	669pb/428pb	<i>Opius</i> sp.	escura/escura	fêmea	RS	FJ560531 - FJ560516
14DSCF1	ITS2/28SD2	659pb/428pb	<i>O. bellus</i>	escura/clara	fêmea	SC	FJ560532- FJ560517
15CSCF2	ITS2/28SD2	666pb/428pb	<i>O. bellus</i>	escura/escura	fêmea	SC	FJ560533 - FJ560518

As populações apresentaram sequências de uso de nucleotídeos semelhantes na composição nucleotídica para o gene ITS2 e 28S rDNA D2. Em ITS2, os nucleotídeos timina e adenina foram os mais abundantes, correspondendo a 38,2 - 37,2% e 34,0 - 35,0%, na composição total de nucleotídeos, enquanto citosina e guanina representaram de 13,1 - 12,5% e 15,5 - 14,9% dos nucleotídeos analisados respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados para fragmento 28S rDNA D2, onde a composição dos códons igualmente foi semelhante. Timina e adenina foram mais abundantes, correspondendo a 36,2 - 36,0% e 24,5 - 26,8%, enquanto citosina e guanina representaram 17,8 - 18,0% e 21,5 - 21,3% da composição nucleotídica. Igualmente ao que ocorre em *Doryctobracon*, o conteúdo G+C nas sequências de *O. bellus* e *Opius* sp. analisadas para 28S rDNA D2 e ITS2, ocorreu numa média de 39,1% e 27,8%, respectivamente (Tabela 10). A importância da análise do conteúdo G+C foi discutida no item 4.4.1.

A partir das sequências produzidas para o marcador 28S rDNA D2, juntamente com as sequências depositadas no banco mundial de dados genéticos (NCBI), foi possível verificar a divergência desse segmento genômico entre as populações de *O. bellus* e *Opius* sp., com as demais sequências disponíveis no NCBI para outras espécies de *Opius*. As análises indicaram que há divergência genética entre as espécies estudadas com as espécies depositadas no banco mundial de dados genéticos, exceto para *O. bellus* (número de acesso Z93650.1). O cladograma produzido para o marcador molecular (28S rDNA D2) formou dois agrupamentos distintos, no qual estão os espécimes utilizados neste estudo, *O. bellus* e *Opius* sp, além de *O. bellus* (número de acesso Z93650.1) e outro agrupamento formado pelas demais espécies disponíveis no NCBI. Apesar de o suporte dos ramos formados entre as espécies de *Opius* (NCBI) indicarem valores de *bootstrap* inferior a 50%, no clado formado pelo agrupamento dos morfotipos analisados e por *O. bellus* (NCBI) destaca-se pelo suporte recebido, pois o agrupamento formado pelos morfotipos suportam o ramo em 100% (Figura 21)

Tabela 10 – Composição nucleotídica, tamanho e conteúdo G+C (guanina + citosina) para as sequências obtidas pelo ITS2 e 28S rDNA D2 de *Opius bellus* e *Opius* sp. (legendas ver Tabela 9)

Amostras	ITS2						28S rDNA D2					
	Tamanhos (pb)	Conteúdos G+C (%)	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	Tamanhos (pb)	Conteúdos G+C (%)	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)
1AAMM1	661	28,0	37,4	12,7	34,6	15,3	428	39,1	36,2	17,8	24,8	21,3
2BAMM2	661	27,9	37,5	12,6	34,6	15,3	428	39,1	36,2	17,8	24,8	21,3
3CAMM3	666	27,7	38,1	12,8	34,2	14,9	428	39,1	36,2	17,8	24,8	21,3
4AAMF1	662	27,8	37,5	12,5	34,7	15,3	428	39,1	36,2	17,8	24,8	21,3
5DAMF2	661	28,0	37,4	12,6	34,6	15,4	428	39,1	36,2	17,8	24,8	21,3
6AAPM1	665	27,8	38,2	12,8	34,0	15,0	428	39,1	36,2	17,8	24,8	21,3
7AAPF1	659	28,2	37,3	12,7	34,4	15,5	428	39,5	36,0	18,0	24,5	21,5
8ARNF1	659	27,9	37,5	12,7	34,6	15,2	428	39,1	36,2	17,8	24,8	21,3
9DRNF2	663	27,4	37,7	12,5	34,8	14,9	428	39,1	36,2	17,8	24,8	21,3
10DRJF1	663	27,9	37,7	12,8	34,4	15,1	428	39,1	36,2	17,8	24,8	21,3
11DFOB1	658	28,4	37,2	13,1	34,3	15,3	428	39,1	36,2	17,8	24,8	21,3
12DRSF1	663	27,8	38,0	12,7	34,2	15,1	428	39,1	36,2	17,8	24,8	21,3
13CRSF2	669	27,7	37,8	12,6	34,5	15,1	428	39,5	36,0	18,0	24,5	21,5
14DSCF1	659	28,1	37,5	12,6	34,4	15,5	428	39,1	36,2	17,8	24,8	21,3
15CSCF2	666	27,4	37,7	12,5	35,0	14,9	428	39,1	36,2	17,8	24,8	21,3

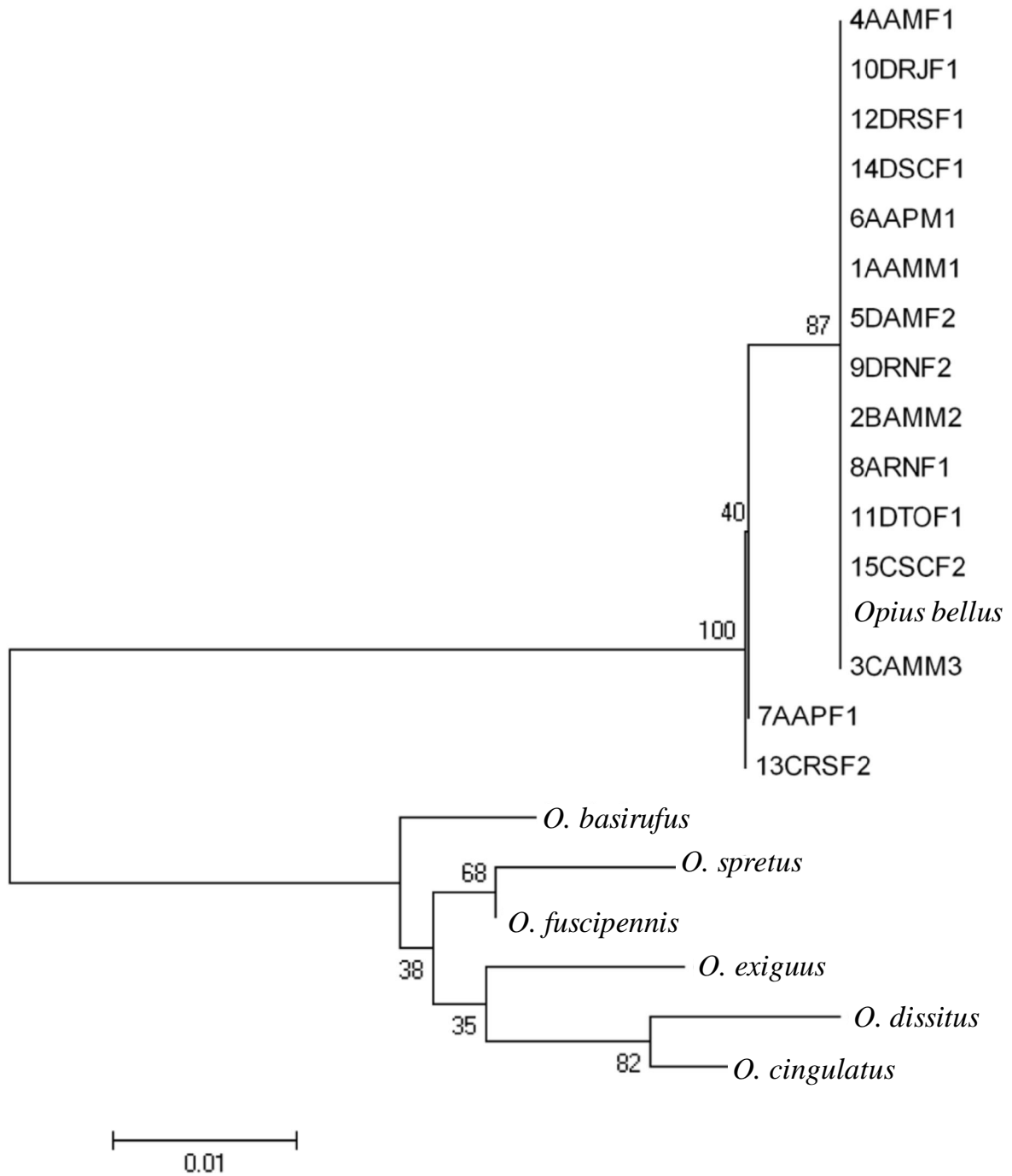


Figura 21 – Árvores linearizadas de Neighbour-Joining (NJ) para populações de *Opius bellus* e *Opius* sp. produzidas a partir da análise de seqüências de nucleotídeos da porção 28S rDNA D2. (legendas ver Tabela 9)

A similaridade genética entre os indivíduos com tíbias posteriores escuras (*O. bellus*) com aqueles com tíbias posteriores claras (*Opius* sp.) foi, em geral, elevada para o marcador ITS2, independentemente da coloração dos apêndices (tíbias e antenas) e da origem geográfica dos indivíduos. Assim, foi possível observar que espécimes com tíbias claras do AM (1 - 4AAMF1) e tíbias escuras de SC (2 - 14DSCF1) apresentam similaridade de 99%, além de indivíduos que apresentam ápice das antenas claros AM (3 - 5DAMF2) e escuros AM (3 - 5BAMM2) igualmente com similaridade de 99% (Tabela 11). Alguns indivíduos apresentaram valores de similaridade bastante inferiores e esse resultado pode estar relacionado a fatores de origem ambiental.

A distância genética produzida pelas análises das sequências do 28S rDNA D2 entre os morfotipos neste estudo, juntamente com as sequências depositadas no banco mundial de dados genéticos NCBI, apoiam os resultados do cladograma gerado na Figura 21. Foi possível visualizar a alta similaridade entre os morfotipos que apresentavam grau de variação na coloração de suas tíbias posteriores e antenas (99% a 100%), independentemente de suas origens geográficas. Observou-se também a proximidade genética entre os espécimes analisados com *O. bellus* (número de acesso Z93650.1) depositado no NCBI (99%) (Tabela 12). As demais espécies, como *Opius basirufus*, *O. cingulatus*, *O. dissitus*, *O. exiguus*, *O. fuscipennis* e *O. spetrus*, utilizadas na comparação com as espécies deste estudo, apresentaram similaridade inferior a 90%, mostrando, de fato, a divergência entre as mesmas. A partir deste resultado, pode-se concluir que os morfotipos, independentemente da cor das tíbias posteriores e antenas, representam, na verdade, uma mesma espécie.

Tabela 11 - Matriz de similaridade genética da porção ITS2 rDNA de *O. bellus* e *Opius* sp

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-														
2	0,99	-													
3	0,99	0,99	-												
4	0,99	0,99	0,99	-											
5	0,99	0,99	0,99	0,99	-										
6	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99	-									
7	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	-								
8	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,99	-							
9	0,98	0,97	0,98	0,98	0,98	0,97	0,98	0,97	-						
10	0,97	0,96	0,97	0,97	0,97	0,96	0,97	0,96	0,98	-					
11	0,98	0,97	0,97	0,97	0,98	0,97	0,98	0,97	0,98	0,98	-				
12	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,98	0,97	0,99	-			
13	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,92	0,93	0,93	0,94	0,93	0,93	0,93	-		
14	0,93	0,93	0,93	0,93	0,94	0,93	0,94	0,93	0,94	0,94	0,94	0,94	0,99	-	
15	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,97	0,97	-

1. 4AAMF1, **2.** 14DSCF1, **3.** 5DAMF2, **4.** 1AAMM1, **5.** 2BAMM2, **6.** 7AAPF1, **7.** 8ARNF1, **8.** 11DFOB1, **9.** 9DRNF2, **10.** 15CSCF2, **11.** 10DRJF1, **12.** 12DRSF1, **13.** 3CAMM3, **14.** 6AAPM1, **15.** 13CRSF2 (legendas ver Tabela 9)

Tabela 12 - Matriz de similaridade genética da porção 28S rDNA D2 de *O. bellus* e *Opius* sp

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1	-																						
2	1,00	-																					
3	0,99	0,99	-																				
4	0,99	0,99	1,00	-																			
5	0,99	0,99	1,00	1,00	-																		
6	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	-																	
7	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	-																
8	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	-															
9	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	-														
10	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	-													
11	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	-												
12	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	-											
13	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	-										
14	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	-									
15	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	-								
16	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	-						
17	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	-					
18	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,98	-				
19	0,90	0,90	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,90	0,94	0,94	-			
20	0,89	0,90	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,96	0,97	0,95	-		
21	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,96	0,97	0,94	0,97	-	
22	0,90	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,90	0,97	0,98	0,94	0,97	0,97	-

1. 7AAPF1, 2. 13CRSF2, 3. 1AAMM1, 4. 2BAMM2, 5. 3Camm3, 6. 4AAMF1, 7. 5DAMF2, 8. 6AAPM1, 9. 14DSCF1, 10. 15CSCF2; 11. 12DRSF1; 12. 11DToF1; 13. 10DRJF1; 14. 9DRNF2; 15. 8ARNF1; 16. *O. bellus*; 17. *O. spretus*; 18. *O. fuscipennis*, 19. *O. dissitus*, 20. *O. cingulatus*; 21. *O. exiguus*; 22. *O. basirufus*. (legendas ver Tabela 9)

As análises moleculares por meio do uso dos marcadores ITS2 e 28S rDNA D2 revelaram diferenças no uso desses marcadores para *O. bellus* e *Opius* sp., porém o resultado aponta para a similaridade entre os morfotipos investigados. Variações intraespecíficas encontradas com o uso do marcador ITS2 e a indisponibilidade de sequências dessa região para outras espécies de *Opius* no banco mundial de dados genéticos (NCBI) dificultaram *a priori* a definição taxonômica dos indivíduos. Porém, por meio do marcador 28S rDNA D2, foi possível determinar a similaridade intrapopulacional e interpopulacional para o tamanho e composição das sequências obtidas. Assim, os espécimes com tibia clara/antena clara, tibia clara/antena escura, tibia escura/antena clara e tibia escura/antena escura, provenientes de localidades geográficas distintas, apresentaram elevada similaridade na análise de suas sequências, mesmo quando comparadas com a sequência de *O. bellus* (número de acesso Z93650.1), além de ter sido visualizada divergências com as demais sequências do gênero depositados no NCBI, indicando a congruência desses morfotipos.

Quando se observa as distâncias genéticas entre os morfotipos das localidades analisados pelo marcador ITS2, percebe-se que alguns indivíduos são divergentes, como constatada entre as populações do AM (3Camm3) e AP (7AAPF1), 92%; SC (14DSCF1), AP (6AAPM1) e AM (3Camm3), 93% (Tabela 11). As diferenças encontradas por meio das distâncias genéticas certamente estão relacionadas com o habitat de origem dos espécimes e ao parasitismo em diferentes espécies de larvas hospedeiras e fruteiras. As regiões Norte e Sul possuem características ambientais e climáticas próprias e amplamente distintas uma da outra, estando os indivíduos sujeitos a diferentes regimes de temperatura, ao parasitismo em diferentes espécies de moscas hospedeiras, e fruteiras regionais nativas. A divergência encontrada entre indivíduos provenientes do Amazonas e Amapá pode estar ligada à ampla faixa de Floresta Amazônica e ao corte dos rios permitindo que as habitações fiquem concentradas nas capitais, onde provavelmente foram coletados os espécimes deste estudo. Assim, o fluxo gênico entre as populações desses morfotipos nessa região é mais difícil, produzindo diferenças marcantes como podem ser observadas nas distâncias genéticas das populações da região Amazônica 1 - 4AAMF1 e 13 - 3Camm3 - 93% e 3 - 5DAMF2 e 13 - 3Camm3 - 93%) e também entre as populações do AM e AP (6 - 7AAPF1 e 13 - 3Camm3) (92%) (Tabela 11).

Opius bellus apresentou grande plasticidade fenotípica quando foram analisados espécimes provenientes do AM, SC e RS. A variação cromática foi observada quando foram comparadas populações da região Norte e Sul, além de ser verificada ampla variação de cor

intrapopulacional no estado do AM. Os espécimes do AM apresentavam fenótipo mais claro, ou seja, corpo mais amarelado e tíbias posteriores escurecidas (*O. bellus*), no entanto, a intensidade de cor das tíbias posteriores variava gradualmente para o claro, às vezes, dificultando a separação visual entre *O. bellus* e *Opius* sp. (exemplares de identidade duvidosa foram excluídos das análises). Foram também observadas nessas populações variações na coloração do ápice das antenas, ora apresentando ápice mais claro, ora totalmente escuro (Figura 11). No entanto, as populações de *O. bellus* provenientes da região Sul (SC e RS) apresentaram coloração mais intensa, tanto no corpo, vermelho-amarelado, como nas tíbias posteriores, completamente escurecidas. O escurecimento, às vezes, não se limitava apenas às tíbias posteriores, podendo apresentar-se também na perna inteira, como foi constatado em alguns indivíduos do RS. Foi observado também o aparecimento de manchas escuras no mesoescuto, pronoto, mesopleura e, algumas vezes, na parte posterior da cabeça, além dos últimos antenômeros, apresentarem-se sempre escurecidos, fato não observado nas populações do AM (Figura 22).

A presença de manchas escuras no mesoescuto é uma característica comum a *Opius bellus*. No entanto, a plasticidade fenotípica é comum aos insetos e diversos são os fatores que promovem essas mudanças, como temperatura e hospedeiros. *Drosophila melanogaster* (Meigen) e *D. simulans* (Sturtevant) apresentam pigmentação do corpo extremamente variável devido ao polimorfismo genético intrapopulacional e plasticidade fenotípica ligada ao aumento da temperatura (GIBERT et al., 2004). A influência da temperatura em *Pnigalio soemius* (Walker) (Hymenoptera Eulophidae) resultou em forte influência desse fator na coloração dos tergitos do gáster e de outras partes do corpo, com tendência a apresentar maior escurecimento em indivíduos criados em temperaturas mais baixas. A pigmentação variou de 5 a 100% em fêmeas criadas a 10°C, apresentando seus tergitos completamente enegrecidos, enquanto um mínimo de pigmentação foi encontrado em torno de 25°C (BERNARDO; PEDATA; VIGGIANI, 2007).

Os insetos provenientes de locais em que a temperatura é mais baixa tendem a apresentar coloração mais intensa, ao passo que aqueles que se desenvolvem em temperaturas mais altas possuem fenótipos mais claros. A clássica interpretação da função adaptativa de tais variações reforça a hipótese de que indivíduos de cores escuras absorvem mais radiação solar visível ou infravermelha em baixas temperaturas (GIBERT et al., 2004). Em espécies polimórficas, indivíduos morfologicamente escuros geralmente se aquecem mais rapidamente que os pálidos,

como constatado em *Tetrix subulata* (L.) (Ortoptera: Tetrigidae), cujos indivíduos negros atingem temperatura média de 49% em relação aos de cor cinza (FORSMAN, 1997).

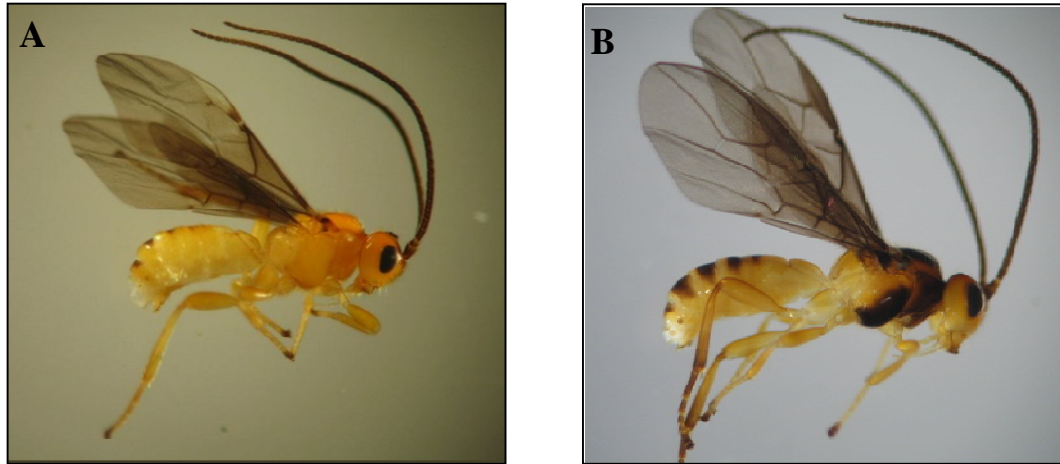


Figura 22 - (A) *Opius bellus* originário do AM, sem manchas no corpo e (B) *Opius bellus* originário RS com manchas enegrecidas no pronoto, mesoescuto, mesopleura e tergitos do gáster

Apesar de, inicialmente, a temperatura não ter relação com a coloração de *O. bellus*, uma vez que manchas escuras são comuns a essa espécie, é interessante atentar sobre a origem dos espécimes. Os espécimes sem manchas são originários do AM, extremo norte do Brasil, onde predomina o clima equatorial, com temperaturas elevadas (25°C a 27°C) em quase todo ano, ou seja, o clima é quente e constante o ano inteiro, com chuvas abundantes. Ao passo que os espécimes com manchas escuras são originários do RS, extremo sul do Brasil, onde predomina o clima subtropical e é caracterizado por verões quentes e úmidos e invernos frios, portanto, temperaturas inconstantes, sendo a média anual em torno de 20°C. A relação entre esses espécimes e as respectivas regiões geográficas deve ser melhor estudada para se constatar realmente se há relação entre a temperatura e as variações cromáticas descritas. As mudanças ambientais podem afetar diretamente a informação genética dos organismos e a expressão da variação em caracteres. Os efeitos ambientais têm sido detectados por meio de diferentes condições de forma influenciadas por taxas de mutação, recombinação, estabilidade no desenvolvimento dos organismos e a maneira como os genes interagem com o ambiente produzindo fenótipos (HOFFMANN; PARSONS, 1997). Na maioria das espécies, as populações

de várias regiões geográficas experimentam diferentes regimes de temperatura podendo as respostas às variações térmicas do ambiente ser genéticas e/ou fenotípicas e, assim, possivelmente expressar respostas plásticas e/ou evolutivas (LOESCHCKE; BUNDGAARD; BARKER, 1999). Outro fator importante que influencia a mudança na cor dos indivíduos é o hospedeiro. Esse fator foi observado em *Psytalia lounburyi* (Silvestri) (Braconidae: Opiinae), parasitóide de *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera, Tephritidae). Quando criado em larvas de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera, Tephritidae), observou-se que entre a terceira e sexta geração desse parasitóide, ocorreu o desaparecimento de todas as manchas enegrecidas sobre o mesonoto e abdome (BILLAH et al., 2005).

Os marcadores ITS2 e 28S rDNA D2, na definição taxonômica entre *Opius bellus* e *Opius* sp. por meio das análises das sequências genômicas, apontam para o fato desses morfotipos pertencerem a *O. bellus*, sendo a magnitude das respostas plásticas um caráter fenotípico induzido provavelmente por condições ambientais.

4.5 Análises morfométricas e moleculares

A estrutura de variação das análises morfométricas encontradas se mapeia com a estrutura de variação da análise molecular, quando foram utilizadas sequências de DNA nuclear (ITS2 e 28S rDNA D2) no estudo de *D. areolatus*, *Doryctobracon* sp. 1 e *Doryctobracon* sp. 2. Observa-se a similaridade nos resultados por meio dos dendogramas gerados pela morfometria geométrica UPGMA e pelos cladogramas dos marcadores utilizados para discriminação das espécies (Figuras 23 e 24). Semelhante para *O. bellus* e *Opius* sp. a projeção das populações, revelada por meio das análises de morfometria geométrica, são concordantes com os estudos de proximidade genética dessas populações realizadas não apenas nos estados do AP, AM, RN, assim como em outros estados brasileiros, onde foram comparadas sequências de DNA desses dois marcadores moleculares, indicando tratarem da mesma espécie (item ver item 4.4.2).

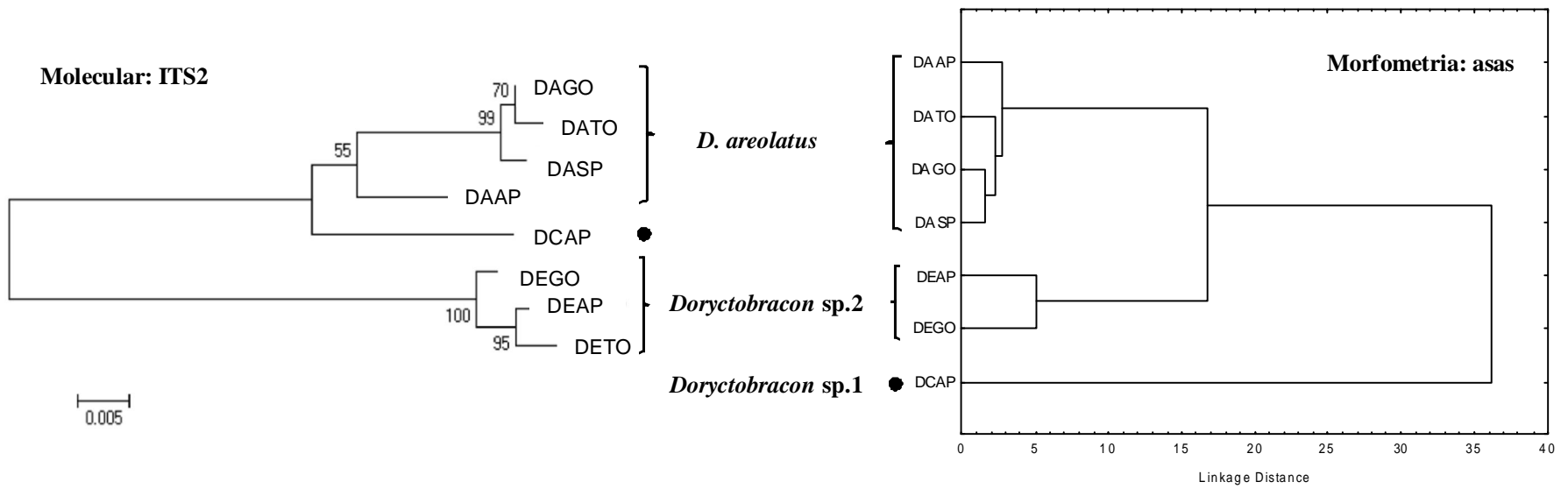
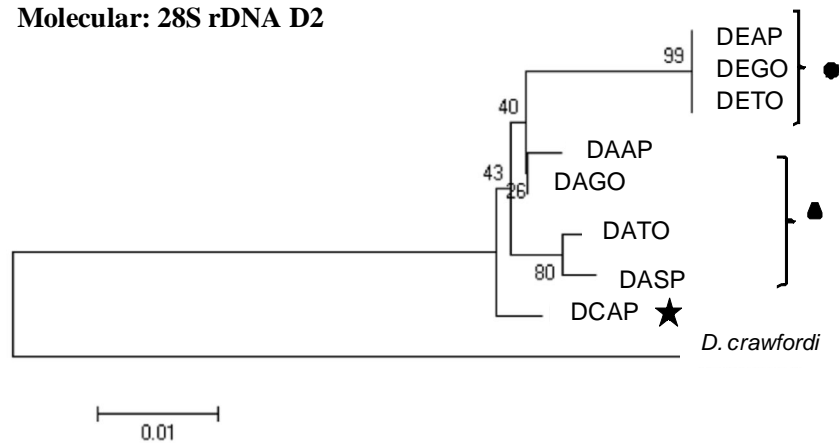


Figura 23 - Comparação entre os métodos: molecular ITS2 (esquerda) construído (MEGA 4.0) com UPGMA análise de *cluster* com distância de Mahalanobis (direita) de *D. areolatus* (AP, GO, TO, SP), *Doryctobracon* sp. 1 (estigma claro) (DCAP) e *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro) (DEAP, DEGO e DETO somente molecular) calculados a partir dos componentes de forma das asas

Molecular: 28S rDNA D2



▲ *Doryctobracon areolatus*

★ *Doryctobracon* sp. 1

● *Doryctobracon* sp. 2

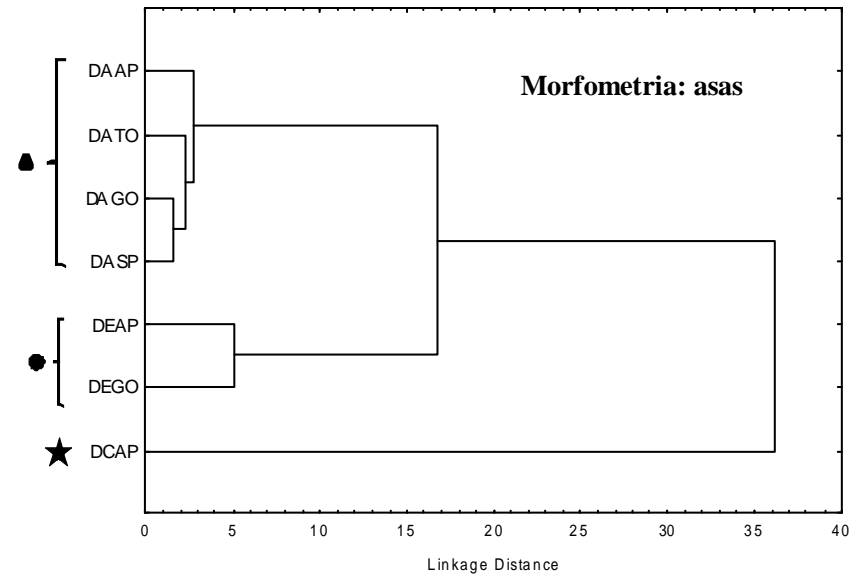


Figura 24 - Comparação entre os métodos: molecular 28S rDNA D2 (esquerda) construído (MEGA 4.0) com UPGMA análise de cluster com distância de Mahalanobis (direita) de *D. areolatus* (AP, GO, TO, SP), *Doryctobracon* sp. 1 (estigma claro) (DCAP) e *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro) (DEAP, DEGO e DETO somente molecular) calculados a partir dos componentes de forma das asas

5 CONCLUSÕES

- As análises morfométricas de *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti), provenientes de localidades das cinco regiões brasileiras, apontam a existência de variabilidade interpopulacional na morfologia das asas.
- *Doryctobracon* sp. 1 (estigma claro) e *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro) são espécies distintas, com base na morfometria geométrica e nos marcadores moleculares ITS2 e 28S rDNA D2.
- As fêmeas de *D. areolatus* (Szépligeti) e *Doryctobracon* sp. 2 apresentam dimorfismo alar (asas maiores do que as dos machos), com base nas análises do tamanho do centróide
- *D. areolatus* (Szépligeti), provenientes do AP, SP, GO e TO, apresenta variabilidade intraespecífica com relação ao tamanho do fragmento em ITS2 e 28S rDNA D2, apresentando similaridade elevada nas sequências para maioria das populações.
- A região do ITS2 e 28S rDNA D2 em *Doryctobracon* sp. 1 (estigma claro) e *Doryctobracon* sp. 2 (estigma escuro) não varia quanto ao tamanho, mas a composição das sequências é significativamente variável.
- Na região ITS2, a variabilidade intrapopulacional é semelhante à interpopulacional (tamanho e composição das sequências) com elevada similaridade e, na região do 28S rDNA D2, tanto o tamanho quanto a similaridade são elevados entre os espécimes de *Opius bellus* Gahan e aqueles considerados como *Opius* sp. ou *Opius* sp. aff. *bellus*.
- Com base nas análises morfométricas e nos marcadores moleculares ITS2 e 28S rDNA D2, os espécimes considerados como *Opius* sp. ou *Opius* sp. aff. *bellus* pertencem a *Opius bellus* Gahan

REFERÊNCIAS

- ALJANABI, S.M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.
- ALUJA, M. Future trends in fruit fly management. In: MCPHERON, B.A.; STECK, G. J. (Ed.). **Fruit fly pests: A World Assessment of Their Biology and Management**. DelRay Beach: St. Lucie Press, 1996. p. 309-320.
- ALUJA, M. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) research in Latin America: myths, realities and dreams. **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, Jaboticabal, v. 28, p. 565-594, 1999.
- ALVAREZ, J.M.; HOY, M. Evaluation of the Ribosomal ITS2 DNA sequences in separating closely related populations of the parasitoid *Ageniaspis* (Hymenoptera: Encyrtidae). **Annals of the Entomological Society American**, College Park, v. 95, n. 2, p. 250-256, 2002.
- ATANASSOVA, P.; BROOKES, C.P.; LOXDALE, H.D.; POWELL, W. Eletroforetic study of aphid parasitoid species of the genus *Aphidius* (Hymenoptera: Braconidae), including evidance for reproductively isolated sympatric populations and cryptic species. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 88, p. 3-13, 1998.
- ATKINSON, D. Temperature and organism size – a biological law for ectotherms? **Advances in Ecological Research**, London, v. 25, p. 1-58, 1994.
- BAYLAC, M.; VILLEMANT, C.; SIMBOLOTTI, G. Combining geometric morphometrics with pattern recognition for the investigation of species complexes. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 80, p. 89-98, 2003.
- BEHURA, S.K. Molecular marks systems in insects: current trends and future avenues. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, n. 11, p. 3087-3113, 2006.
- BELSHAW.R.; QUICKE, D.L.J. A molecular phylogeny of the Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 7, p. 281–293, 1997.
- BELSHAW, R.; FITTON, M.; HERNIOU, E.; GIMENO, C.; QUICKE, D.L.J. A phylogenetic reconstruction of the Ichneumonoidea (Hymenoptera) based on the D2 variable region of 28S ribosomal RNA. **Systematic Entomology**, Oxford, v. 23, p. 109–123. 1998.

- BELSHAW, R.; LOPEZ-VAAMONDE, C.; DEGERLI, N.; QUICKE, D.L.J. Paraphyletic taxa and taxonomic chaining: evaluating the classification of braconine wasps (Hymenoptera: Braconidae) using 28S D2-3 rDNA sequences and morphological characters. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 73, p. 411–424. 2001.
- BELSHAW, R.; QUICKE, D.L.J. Robustness of ancestral state estimates: evolution of life history strategy in ichneumonoid parasitoids. **Systematic Entomology**, Oxford, v. 51, p 450–477, 2002.
- BERBEE, M.L.; TAYLOR, J.W. From 18S ribosomal sequence data to evolution of morphology among the fungi. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.73, p. S677-S683, 1995.
- BERNARDO, U.; PEDATA, P.A.; VIGGIANI, G. Phenotypic plasticity of pigmentation and morphometric traits in *Pnigalio soemius* (Hymenoptera: Eulophidae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 97, p. 101–109, 2007.
- BEZEMER, T.M.; HARVEY, J.A.; MILLS, N.J. Influence of adult nutrition on the relationship between body size and reproductive parameters in a parasitoid wasp. **Ecological Entomology**, London, v. 30, p. 571-580, 2005.
- BILLAH, M.K.; KIMANI-NJOGU, S.; OVERHOLT, W.A.; WHARTON, R.A.; WILSON, D. D.; COBBLAH, M.A. The effect of host larvae on three *Psytalia* species (Hymenoptera: Braconidae), parasitoids of fruit-infesting flies (Diptera: Tephritidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, Wallingford, v. 25, n. 3, p. 168-175, 2005.
- BILLAH, M.K.; KIMANI-NJOGU, S.W.; WHARTON, R.A.; WOOLEY, J.B.; MASIGA, D. Comparison of five allopatric fruit fly parasitoid population (*Psytalia* species) (Hymenoptera: Braconidae) from coffee fields using morphometric and molecular methods. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 98, p. 63-75, 2008.
- BITNER-MATHÉ, B.C.; PEIXOTO, A.A.; KLACZKO, L.B. Morphological variation in a natural population of *Drosophila mediopunctata*: altitudinal cline, temporal changes and influence of chromosome inversions. **Heredity**, London, v. 75, p. 54-61, 1995.
- BITNER-MATHÉ, B.C.; KLACZKO. Size and shape heritability in natural populations of *Drosophila mediopunctata*: temporal, microgeographical variation. **Genetica**, Dordrecht, v. 105, n. 1, p. 35-42, Mar 1999.
- BLACKITH, R. Morphometrics. In: WATERMAN, T.H.; MOROWITZ, J. (Ed.). **Theoretical mathematical biology**. New York: Blaisdell, 1965. p. 225-249.

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

BLANCHARD, E. Dos nuevos opiinos (Hymenoptera: Braconidae) parásitos de tripétidos (Diptera) del género *Anastrepha*. **Revista de investigaciones Agropecuaria INTA**, Buenos Aires, v.5, n.3, p. 21-25, 1966.

BOOKSTEIN, F.L. "Size and shape": a comment on semantics. **Systematic Zoology**, Washington, v. 38, p. 173-180, 1989.

BOOKSTEIN, F.L. **Morphometrics tools for landmark data: geometry and biology**. New York: Cambridge University Press, 1991, 1v

BOOKSTEIN, F.L. Biometrics, biomathematics and morphometric synthesis. **Bulletin of Mathematical Biology**, Elmsford, v. 58, n. 2, p. 313-365, Mar 1996.

BROWN, D.D.; WENSINK, P.C.; JORDAN, E.A. A comparison of the ribosomal DNAs of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem genes. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 63, p. 57-73, Jan 1972.

CAMPBELL, B.; HERATY, J.; RASPLUS, J.Y.; CHAN, K.; STEFFEN-CAMPBELL, J.; BABCOCK C. Molecular systematics of the Chalcidoidea using 28s-D2 rDNA. In: Austin, A. D. and Downton, M. (Ed.). **Hymenoptera: evolution, biodiversity and biological control**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2000. p. 59-73.

CANAL DAZA, N.A.; ZUCCHI, R.A.; SILVA, N.M. da; LEONEL JUNIOR, F.L. Reconocimiento de las especies de parasitoides (Hymenoptera: Braconidae) de moscas de las frutas (Diptera: Tephritidae) em dos municipios del Estado de Amazonas, Brasil. **Boletín Del Museo de Entomología de la Universidad Del Valle**, Cali, v. 2, n. 1/2, p. 1-17, 1994.

CANAL DAZA, N.A.; ZUCCHI, R.A. Parasitoides - Braconidae. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.) **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**. Conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos-FAPESP, 2000. cap. 15, p. 119-126.

CANCINO, J.; MONTOYA, P. Controle Biológico por aumento en moscas de la fruta. **Folia Entomologica Mexicana**, Mexico, v.43, n. 3, p. 257-270, 2004a.

CANCINO, J.; MONTOYA, P. Desirable attributes of mass reared parasitoids for fruit fly control: a comment. **Vedalia**, Berkeley, v. 11, p. 53-58, 2004b.

CARVALHO, R.S.; NASCIMENTO, A.S. Criação e utilização de *Diachasmimorpha longicaudata* para o controle de moscas-das-frutas. In: PARRA, J. P.; BOTELHO, P. S.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. (Ed.). **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Editora Manole, 2002. p. 165-179.

CATERINO, M.S.; CHO, S.F. SPERLING, A.H. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 45, p. 1-54, Jan 2000.

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

CAVALCANTI, M.J.; LOPES, P.R.D. variação geográfica de caracteres quantitativos em *Ogcocephalus vespertilio* (Linnaeus) (Teleostei, Lophiiformes, Ogcocephalidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 125-134, 1998.

CICOLA JUNIOR, A.I. **Identificação de espécies de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) utilizando seqüenciamento da região ITS2 do rDNA**. 2000. 60p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

CLARIDGE, M. F.; DAWAH, H. A.; WILSON, M. R. Species in insect herbivores and parasitoids-sibling species, host races and biotypes. In: CLARIDGE, M.F.; DAWAH, H.A.; RISTAINO, J.B.; MADRITCH, M.; TROUT, C.L.; PARRA, G. PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus phytophthora. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n. 3, p.948-954, 1997.

CORTI, M.; AGUILERA, M.; CAPANNA, E. Phylogeny and size and shape changes in the skull of the South American rodent *Proechimys*. **Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungarica**, Budapeste, v. 44, n. 1/2, p. 139-150, 1998.

COSTA LIMA, A. Vespas parasitas de moscas das frutas (Hymenoptera: Braconidae). **O campo**, Rio de Janeiro, v.76, n.2, p.68-72, 1938.

COSTA, M.; MOURA, M.; MATEUS, R.P. Dimorfismo sexual em *Drosophila antonietae*: Uma abordagem morfométrica. In: SIMPÓSIO DE GENÉTICA, ECOLOGIA E EVOLUÇÃO, 3., WORKSHOP DE PÓS- GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA., 2, 2007. Guarapuava, **Resumos...** Guarapuava: Unicentro, 2007. 197p.

DE BACK, P.; ROSEN, D. **Biological control by natural enemies**. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 440p.

DE MOED, G.H.; DE JONG, G.; SCHARLOO, W. The phenotypic plasticity of wing size in *Drosophila melanogaster*: the cellular basis of its genetic variation. **Heredity**, London, v. 79, p.260-267, 1997.

DE OLIVEIRA, C.M.; LOPES, J.R.S.; DIAS, C.T.D.S.; NAULT, L.R. Influence of latitude and elevation on polymorphism among populations of the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* (DeLong and Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), in Brazil. **Environmental Entomology**, College Park, v. 33, p. 1192–1199, 2004.

DOWTON, M.; AUSTIN, A. D. Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: Apocritan relationships. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 9911–9915, Oct 1994.

DOWTON, M.; AUSTIN, A.D.; ANTOLIN, M.F. Evolutionary relationships among the Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) inferred from partial 16S rDNA gene sequences. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 129–150, May 1998.

DOWTON, M.; BELSHAW, R.A.; AUSTIN, D.; QUICKE, D.L.J. Simultaneous molecular and morphological analysis of braconid relationships (Insecta: Hymenoptera: Braconidae) indicates independent mt-tRNA gene inversions within a single wasp family. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 54, n. 2, p. 210–226, Feb 2002.

DUJARDIN, J.-P; LE PONT, F.; BAYLAC, M. Geographical versus interspecific differentiation of sand flies (Diptera: Psychodidae): Landmark data analysis. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 93, p. 87-90, 2003.

EBEN, A.; BENREY, B.; SIVINSKY, J.; ALUJA, M. Host species and host plants effect on preference and performend of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 29, p. 87-94, 2000.

EITAM, A; HOLLER, T.; SIVINSKI, J; ALUJA, M. Use of host fruit chemical cues for laboratory rearing of *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera: Braconidae) a parasitoid of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 86, n. 2, p. 211-216, Jun 2003.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers.

International Journal of Systematic Bacteriology, Washington, v. 49, p. 329-337, Jan 1999.

FENTON, B.; BIRCH, A.N.E.; MALLOCH, G.; WOODFORD, J.A.T.; GONZALEZ, C.

Molecular analysis of ribosomal DNA from the Aphid *Amphorophora idaei* and an associated fungal organism. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 3, p. 183-189, Aug 1994.

FISCHER, M. Die Opiinae der nearktischen region. 1. Teil. **Polskie Pismo Entomologiczne**, Warszawa, v. 34, p.197-513, 1964.

FISCHER, M. Zusammenfassung der neotropischen Opiinae mit ausschluss der gattung *Opius* Wesm. (Hymenoptera, Braconidae). **Beiträge zur Neotropischen Fauna**, Lisse, v. 5, p. 1-21, 1967.

FISCHER, M. Hymenoptera Braconidae (Opiinae II). **Das Tierreich**, Berlin, v. 96, p. 1-1001, 1977.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica**. São Paulo: EDUSP, 1996. cap. 2 p. 43-66.

FORSMAN, A. Thermal capacity of different colour morphs in the pygmy grasshopper *Tetrix subulata*. **Annales Zoologici Fennici**, Helsinki, v. 34, p. 145-149, 1997.

FOULY, H.M.; WILKINSON, H.T.; CHEN, W. Restriction analysis of internal transcribe spacers and the small subunit gene of ribossomal DNA among four *Gaeumannomyces* species. **Mycologia**, New York, v. 89, p. 590-597, 1997.

FRIESS, M.; BAYLAC, M. Exploring artificial cranial deformation using elliptic Fourier analysis of Procrustes aligned outlines. **American Journal of Physical Anthropology**, Washington, v. 122, n. 1, p. 11-22, 2003.

FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 1992, 1v.

GALLEGO, D.; GALIÁN, J. The internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) of the rDNA differentiates the bark beetles forest pests *Tomicus destruens* and *T. piniperda*. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 10, n. 5, p. 415-420, Oct 2001.

GARGAS, A.; DEPRIEST, P.T. A nomenclature for fungal PCR primers with examples from intron-containing Ssu rDNA. **Mycologia**, New York, v. 88, n. 5, p.745-748, 1996.

- GAULD, I. D. Taxonomy, its limitation and its role in understanding parasitoid biology. In: WAAGE, J.; GREATHEAD, D. (Ed.). **Insect Parasitoids**. New York: Academy Press, 1986, p.1-21.
- GIBERT, P.; CAPY, P.; IMASHEVA, A.; MORETEU, B.; MORIN, J.P.; PÉTAVY, G.; DAVI, J.R. Comparative analysis of morphological traits among *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: genetic variability, clines and phenotypic plasticity. **Genetica**, Dordrecht, v. 120, p.165-179, 2004.
- GILLESPIE, J.J.; MUNRO, J.B.; HERATY, J.M.; YODER, M.J.; OWEN, A.K.; CARMICHAEL, A.E. A Secondary structural model of the 28S rRNA expansion segments D2 and D3 for Chalcidoid wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea). **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 22, n. 7, p. 1593–1608, 2005.
- GIMENO, C.; BELSHAW, R.; QUICKE, D.L.J. Phylogenetic relationships of the Alysiniinae/Opiinae (Hymenoptera: Braconidae) and the utility of cytochrome b, 16S and 28S D2 rRNA. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 273–284, Aug 1997.
- GONZÁLEZ, P.I.; MONTOYA, P.; PEREZ-LACHAUD, G.; CANCINO, J.; LIEDO, P. Superparasitism in mass reared *Diachasmimorpha longicaudata* (Asmead) (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of fruit flies (Diptera: Tephritidae). **Biological Control**, Orlando, v. 40, p.320-326, 2007.
- HATADANI, L.M. **Polimorfismo de coloração em *Drosophila mediopunctata***. 2002. 74p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- HATADANI, L.M.; KLACZKO, L.B. Shape and size variation on the wing of *Drosophila mediopunctata*: Influence of chromosome inversions and genotype-environment interaction. **Genetica**, Dordrecht, 8p. DOI 10.1007/s10709-007-9217-7, 2007.
- HERATY, J.M.; HAWKS, D.; KOSTECKI, J.S.; CARMICHAEL, A. Phylogeny and behavior of the Gollumiellinae, a new subfamily of the ant parasitic Eucharitidae (Hymenoptera: Chalcidoidea). **Systematic Entomology**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 544–559, Oct 2004.
- HILLIS, D.M.; DAVIS, S.K.; Ribosomal DNA: intraspecific polymorphism concerted evolution and phylogeny reconstruction. **Systematic Zoology**, Washington, v. 37, p. 63-66, 1988.
- HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quartely Review of Biology**, New York, v. 66, p. 411–453, Dec 1991.

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

HOFFMAN, A.A.; PARSONS, P.A. **Extreme environmental change and evolution**. 2nd ed. London: Cambridge University Press, 1997. 259p.

HOFFMANN, A.A.; WOODS, R.E.; COLLINS, E.; WALLIN, K.; WHITE, A.; MCKENZIE, J. A. Wing shape versus asymmetry as an indicator of changing environmental conditions in insects. **Australian Journal of Entomology**, Orange, v. 44, p. 233-243, 2005.

HOY, M.A. **Insect molecular genetics**. San Diego: Academic Press Elsevier, 2003. 544p.

HUGALL, A.J.; STANTON, J.; MORITZ, C. Reticulate evolution and origins of ribosomal internal transcribed spacer diversity in apomictic *Meloidogyne*. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 16, p. 157-164, 1999.

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

JI, Y.-J.; ZHANG, D., -X.; HE, L. -J. Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 3, n.4, p. 581-585, Oct 2003.

KAMBHAMPATI, S.; VOLKL, W.; MACKAUER, M. Phylogenetic relationships among genera of Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae) based on DNA sequence of the mitochondrial 16S rRNA gene. **Systematic Entomology**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 437-445, Oct 2000.

KIMANI-NJOGU, S.W.; OVERHOLT, W.A.; WOOLLEY, J. WALKER, A. Biosystematics of the *Cotesia flavipes* species complex (Hymenoptera: Braconidae): morphometrics of selected allopatric populations. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 87, p. 61-66, 1997.

KLINGENBERG, C. P. Morphometrics and the role of the phenotype in studies of the evolution of developmental mechanisms. **Gene**, Amsterdam, v. 287, p. 3-10, 2002.

LAUDONIA, S.; VIGGIANI, G. Effetto della temperatura sulla colorazione degli adulti di *Encarsia partenopea* Masi (Hymenoptera: Aphelinidae). **Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria Filippo Silvestri**, Portici, v. 50, p. 141-146, 1993.

LAWRENCE, P.O.; BARANOWSKI, R.M.; GREANY, P.D. Effect of host age on development of *Biosteres* (= *Opius*) *longicaudatus*, a parasitoid of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 59, n. 1, p.33-39, 1976.

LEONEL JUNIOR, F.L. **Espécies de Braconidae (Hymenoptera) parasitóides de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no Brasil**. 1991. 83p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991.

LEONEL JUNIOR, F.L.; ZUCCHI, R.A.; WHARTON, R.A. Distribution and tephritid hosts (Diptera) of braconid parasitoids (Hymenoptera) in Brazil. **International Journal of Pest Management**, London, v. 41, n. 4, p. 208-213, 1995.

LEONEL JUNIOR, F.L.; ZUCCHI, R.A.; CANAL DAZA, N.A. Parasitismo de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) por Braconidae (Hymenoptera) em duas localidades do Estado de São Paulo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 199-206, 1996.

LOESCHCKE, V.; BUNDGAARD, J.; BARKER, J.S.F. Reaction norms and genetic parameters at different temperatures for thorax and wing size traits in *Drosophila aldrichi* and *D. buzzatii*. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v.12, p.605-623, 1999.

LOH, R.; DAVID, J.R.; DEBAT, V.; BITNER-MATHÉ, B.C. Adaptation to different climates results in divergent plasticity phenotypic of wing size and shape in an invasive *Drosophilid*. **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 87, n. 3, p. 209-217, Dec 2008.

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

McLAIN, D.K; WESSON, D.M.; COLLINS, F.H.; OLIVER Jr., J.H. Evolution of the rDNA spacer, ITS2 in the ticks *Ixodes scapularis* and *I. pacificus* (Acari: Ixodidae). **Heredity**, London, v. 75, p. 303-319, Sep 1995.

MALAVASI, A.; NASCIMENTO, A.; PARANHOS, B.A.J.; COSTA, M.L.C.; WALDER, J.M. M. Implementation of a medfly, fruit fly parasitoids and codling moth rearing facility in northeastern Brazil. In: VREYSEN, M.J.B.; ROBINSON, A.S.; HENDRICH, J. **Area-wide control of insect pests: From research to field implementation**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 527-534.

MARDULYN, P.; WHITFIELD, J.B. Phylogenetic signal in the COI, 16S, and 28S genes for inferring relationships among genera of Microgastrinae (Hymenoptera; Braconidae): evidence of a high diversification rate in this group of parasitoids. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 12, n. 3, p. 282–294, 1999.

MARINHO, C. F. **Espécies de parasitóides (Hymenoptera: Braconidae) de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no estado de São Paulo: caracterização taxonômica, distribuição geográfica e percentagem de parasitismo.** 2004. 88p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

MATRANGOLO, W.J.R.; NASCIMENTO, A.S.; CARVALHO, R.S.; MELO, E.D.; de JESUS, M. Parasitóides de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) associados a fruteiras tropicais. **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, Jaboticabal, v. 27, p. 593-603, dez 1998.

MELEN, G.J.; PESCE, C.G.; ROSSI, M.S.; KORNBLIHTT, A.R. Novel processing in a mammalian nuclear 28S pre-rRNA: tissue-specific elimination of an “intron” bearing a hidden break site. **EMBO Journal**, Oxford, v. 18, n. 11, p. 3107-3118, 1999.

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

MENEZES, B.F.; VIGODER, F.; PEIXOTO, A.; BITNER-MATHÉ, B.C. A forma das asas e sucesso dos machos em *Drosophila melanogaster*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54, 2008. Salvador. **Resumos...** 16 a 19 de set. Salvador, 2008. 271.p.

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

MONTEIRO, L.R.; DINIZ-FILHO, J.A.F.; REIS, S.F.; ARAÚJO, E.D. Geometric estimates of heritability in biological shape. **Evolution**, Lancaster, v. 56, p 563-572, 2002.

MONTOYA, P.; LIEDO, P.; BENREY, B.; CANCINO, J.; BARRERA, J. F.; SIVINSKI J.; ALUJA, M. Biological Control of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in mango orchards through augmentative releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control**, Orlando, v.18, p. 216-224, Jul 2000.

MORIN, J.P.; MORETEAU, B.; PÉTAVY, G.; DAVID, J.R. Divergence of reaction norms of size characters between tropical and temperate populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 12, n. 2, p. 329-339, Mar 1999.

MORRONE, J.J. Panbiogeografía, componentes bióticos y zonas de transición. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 48, n. 2, p. 149-162, Jun 2004.

MORRONE, J.J. Biogeografía neotropical. In: FERÁNDZ, F.; SHARKEY, M. J. Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical. Bogotá, Sociedad Colombiana de Entomología y Universidad Nacional de Colombia, 2006. cap. 7 p. 133-141.

MYLLYS, L.; LOHTANDER, K.; KALLERSJO, M.; TEHLER, A. Sequence insertions and ITS date provide congruent information on *Roccella canariensis* and *R. tuberculata* (Arthoniales, Euascomycetes) phylogeny. **Molecular Phylogenetics Evolution**, Orlando, v. 12, p. 295-309, Aug 1999.

NAHUM, L.A. Evolução dos genomas. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2001. p. 82-96.

NOACH, E.J.K.; DE JONG, G.; SCHARLOO, W. Phenotypic plasticity of wings in selection lines. **Heredity**, London, v. 79, p. 1-9, Jul 1997.

ONYABE, D.Y.; CONN, J.E. Intragenomic heterogeneity of ribosomal DNA spacer (ITS2) varies regionally in the Neotropical malaria vector *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 435-442, Nov 1999.

OVRUSKI, S.; ALUJA, M.; SIVINSKI, J.; WHARTON, R. Hymenopteran parasitoids on fruit-infesting Tephritidae (Diptera) in Latin America and the Southern United States: Diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. **Integrated Pest Management Reviews**, London, v. 5, n. 2, p. 81-107, Jun 2000.

OVRUSKI, S.M. Nuevos aportes a la taxonomía de las especies de Opiinae (Hymenoptera: Braconidae), parasitoides de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) en la provincia de Tucumán, Argentina. **Acta Zoológica Lilloana**, Tucumán, v. 47, n. 1/2, p. 15-44, 2003.

PARANHOS, B.A.J. Biofábrica Moscamed Brasil: tecnologia ambientalmente segura no combate às pragas. In: SIMPÓSIO DE MANGA DO VALE DO SÃO FRANCISCO, 2., 2007, Juazeiro. **Palestras..**, Petrolina: EMBRAPA Semi-Árido, 2007. 1 CD-ROM. (Embrapa Semi-Árido. Documentos, 198).

PARANHOS, B.A.J.; MENDES, P D.; PAPADOPOULOS, N.T.; WALDER, J.M.M. Dispersion patterns of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) in citrus orchards in southern Brazil. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v.17, p. 375-385, 2007.

PARTRIDGE, L.; BARRIE, B.; FOWLER, K.; FRENCH, V. Evolution and development of body size and cell size in *Drosophila melanogaster* in response to temperature. **Evolution**, Lancaster, v. 48, n. 4, p.1269-1276, 1994.

PIGLIUCCI, M.; MURREN, M.; SCHLICHTING, C.D. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 209, p. 2362-2367, 2006.

PINTO, J.D.; VELTEN, R.K.; PLATNER, G.R.; OATMAN, E.R. Phenotypic plasticity and taxonomic characters in *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 82, n. 4, p. 414-425, 1989.

POLASZEC, A.; DESSART, P. Taxonomic problems in the *Aphanogmus hakonensis* species complex (Hymenoptera: Ceraphronidae) common hyperparasitoids in biocontrol programmes against Lepidopterous pests in the tropics. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 86, n. 4, p. 419-422, 1996.

PRETORIUS, E.; CLARK, F.C. Geometric morphometric analysis of the male and female body shape of *Hyalomma truncatum* and *H. Marginatum rufipes* (Acari: Ixodidae). **International Journal of Acarology**, Oak Park, v. 26, n. 3, p. 229-238, 2000.

PRETORIUS, E. Using geometrics morphometrics to investigate wing dimorphism in males and females of Hymenoptera – a case study based on the genus *Tachyspex* Kohl (Hymenoptera: Sphecidae: Larrinae). **Australian Journal of Entomology**, Orange, v. 44, p113-121, 2005.

PURCELL, M.F. Contribution of biological control to integrated pest management of Tephritidae fruit flies in the tropics and subtropics. **International Pest Management Reviews**, London, v. 3, n. 2, p. 63-83, Jun 1998.

QUERINO, R.B.; MORAES, R.; ZUCCHI, R.A. Relative warp analysis to study morphological variations in the genital capsule of *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, p. 1-10, 2002.

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

REYMENT, R.A; BLACKITH, R.E; CAMPBELL, N.A. **Multivariate morphometrics**. New York: Academic Press, 1981. 233p.

RICH, S.M.; ROSENTHAL, S.R.; TELFORD III, S.R.; SPIELMAN, D.L.; AYALA, F.J Heterogeneity of the internal transcribed spacer (ITS2) region within individual deer ticks. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 6, p. 123-129, 1997.

- RINDERER, T.E. The identification of Africanized honey bees: an assessment of morphometric, biochemical, and molecular approaches. **Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungarica**, Budapest, v. 44, p. 177-194, 1998.
- RISTAINO, J.B.; MADRITCH, M.; TROUT, C.L.; PARRA, G. PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus phytophthora. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n. 3, p.948-954, 1998.
- RODERICK, G.K. Geographical structure of insect populations: gene flow, phylogeography and their uses. **Annual Review Entomology**, Standford, v. 41, p. 325-352, Jan 1996.
- ROHLF, F.; SLICE, D. Extensions of the procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. **Systematic Zoology**, Washington, v. 39, n. 1, p. 40-59, Mar 1990.
- ROHLF, F.; BOOKSTEIN, F.L. Proceedings of the Michigan morphometric workshop. s.l: University of Michigan Museum of Zoology, Michigan, 1991. 380p. (Special Publication, 2).
- ROHLF, F.J.; MARCUS, L.F. A revolution in morphometrics. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 8, p. 129-132, 1993.
- ROHLF, F.J. On applications of geometric morphometrics to studies of ontogenia of phylogeny. **Systematic Biology**, Washington, v. 47, p. 147-158, 1998.
- ROHLF, F.J. **Program tpsDig, version 1.40**. Stony brook: State University of New York, Department of Ecology and Evolution, 2004.
- ROHLF, F.J. **Program tpsUtil, version 1.38**. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook., 2006.
- ROHLF, F.J. **Program tpsRegr, version 1.33**. Stony Brook: State University of New York, Department of Ecology and Evolution, 2007.
- ROHLF, F.J. **Program tpsRwl version 1.45**. Stony Brook: State University of New York, Department of Ecology and Evolution, 2007.
- SALVO, A.; VALLADARES, G. Intraspecific size variation in polyphagous parasitoids (Hymenoptera: Parasitica) of leaf miners and its relation to host size. **Entomophaga**, Paris, v. 40, n. 2, p. 273–280, Jun 1995.
- SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide, version 6.4**. Cary, 1990.

SCHLISERMAN, P.; OVRUSKI, S. M.; DECOLL, O. The establishment of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) in Misiones, Northeastern Argentina. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 86, n. 4, p. 491-492, Dec 2003.

SCHULMEISTER, S. Simultaneous analysis of basal Hymenoptera (Insecta): Introducing robust-choice sensitivity analysis. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v.79, p. 245-275, 2003.

SELIVON, D. Biologia e padrões de especiação. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. **Moscas-das-frutas de Importância Econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2000. cap. 2 p. 25-28.

SHARKEY, M.J.; WHARTON, R.A. Morphology and Terminology In: WHARTON, R.A.; MARSH, P.M.; SHARKEY, M.J. (Ed.), **Manual of the New World Genera of the Family Braconidae (Hymenoptera)**. Lawrence: Allen Press, 1997. p. 19-37.

SHI, M.; CHEN, X.X.; VAN ACHTERBERG, C. Phylogenetic relationships among the Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) inferred from partial 16SrDNA, 28SrDNA D2, 18S rDNA gene sequences and morphological characters. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Chicago, v. 37, p 104-116, 2005.

SHIPUNOV, A. B.; BATEMAN, R.M. Geometric morphometrics as a tool for understanding *Dactylorhiza* (orchidaceae) diversity in European Russia. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 25, p. 1-12, 2005.

SILVA, I.M.M.S.; HONDA, J.; VAN KAN, F.; HU, J.; NETO, L.; PINTUREAU, B.; STOUTHAMER, R. Molecular Differentiation of five *Trichogramma* species occurring in Portugal. **Biological Control**, Orlando, v. 16, p. 177-184, Oct 1999.

SIVINSKI, J.; WEEB, J.C. Acoustic signals produced during courtship in *Diachasmimorpha longicaudata* (= *Biosteres*) *longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) and other Braconidae. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 82, n. 1, p 116- 120, 1989.

SIVINSKI, J. The past and potential of biological control of fruit flies. In: McPHERON, B. A.; STECK, G. J. (Ed.). **Fruit fly pest: A World Assessment of their Biological and Management**. DelRay Beach:St. Lucie Press, 1996. p. 369-375.

SOUZA FILHO, M.F. **Biodiversidade de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) e seus parasitóides (Hymenoptera) em plantas hospedeiras no Estado de São Paulo**. 1999. 173p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

SOUZA, A.R.; LOPES, E.N.; SILVA, M.; LOPES, G.N.; DIAS, A.M.P.; QUERINO, R.B.; ALVARENGA, C.D.; STRIKIS, P. Primeiro registro de *Asobara obliqua* (Papp, 1969) (Hymenoptera: Braconidae, Alysiinae) parasitando *Lonchaeidae* em *Ziziphus joazeiro* mart. (Rhamnaceae) no Brasil. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 10., 2007, Brasília. **Anais...** Brasília : Embrapa Recursos Genéticos, 2007. v. 1. p. 189-189.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 10, n. 3, p. 512-526, May 1993.

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

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

TAYLOR, D.B.; MOON, R.; GIBSON, G.; SZALANSKI, A. Genetic and morphological comparisons of new and world populations of *Spalangia* Species (Hymenoptera: Pteromalidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park., v. 99, n. 5, p. 799-808, 2006.

THOMAS, R.H.; BARKER, J. S. F. Quantitative genetic analysis of the body size and shape of *Drosophila buzzatii*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, n. 5, p. 598-608, Jan 1993.

THOMPSON, D.W. **On growth and form**. London: Cambridge University Press, 1917. 753p.

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

TORRES, R.A., MATOSO, D.A, ARTONI, R.F. Genética de peixes neotropicais II. Biologia Molecular de peixes Neotropicais. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v. 10, n. 2, p. 27-37, Jun 2004.

UNRUH, T.R.; MESSING, R. Intraspecific biodiversity in hymenoptera: Implications for conservation and biological control. In: LASALLE, J.; GAULD, I.; (Ed.). **Hymenoptera and Biodiversity**. Wallingford: CAB International, 1993. p. 27-52.

VELOSO, V.R.S. **Dinâmica populacional de *Anastrepha* spp. e *Ceratitis capitata* (Wied., 1824) (Diptera, Tephritidae) nos cerrados de Goiás.** 1997. 114p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1997.

VIGGIANI, G. Osservazioni sulla morfo-biologia del *Pnigalio mediterraneus* Ferr. & Del. (Hymenoptera: Eulophidae). **Entomophaga**, Paris, v. 8, p. 191–198, 1963.

VIGGIANI, G. Variations and biological traits of *Coccophagus gossypariae* Gahan (Hymenoptera: Aphelinidae). **Biological Control**, Orlando, v.16, p. 43–46, Sep 1999.

VILLEMANT, C.; SIMBOLOTTI, G.; KENIS, M. Discrimination of *Eubazus* (Hymenoptera, Braconidae) sibling species using geometric morphometrics analysis of wing venation. **Systematic Entomology**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 625-634, Oct 2007.

WALLACE, A.R. On the monkeys of the Amazon. **Proceedings of the Zoological Society of London**, London, v. 20, p.107-110, 1852.

WALDER, J.M.M. Produção de moscas-das-frutas e seus inimigos naturais: associação de moscas estéreis e controle biológico. In: PARRA J.R.P.; BOTELHO, P.S.M., CORRÊA-FERREIRA, B.S, BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores.** São Paulo: Editora Manole, 2002, p. 181-190.

WEEKERS, P.H.H.; DE JONCKHEERE, J.F.; DUMONT, H. Phylogenetic relationships inferred from Ribosomal ITS Sequences and Biogeographic patterns in Representatives of the genus *Calopteryx* (Insecta: Odonata) of the West Mediterranean and adjacent West European Zone. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Chicago, v. 20, n. 1, p. 88-99, Jul 2001.

WHARTON, R. A. Variation in *Opius hirtus* Fischer and discussion of *Desmiostoma* Foerster (Hymenoptera: Braconidae). **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, Washington US, v. 85, n. 2, p. 327-330, 1983.

WHARTON, R.A. Classification of the braconidae sub-family Opiinae (Hymenoptera). **Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 12, p. 333-360, 1988.

WHARTON, R.A. Classical biological control of Fruit infesting Tephritidae. In: ROBINSON, A. AND HOOPER, G. (Ed.). **Fruit Flies: their biology, natural enemies and control.** Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 303-312.

WHARTON, R. A. Subfamília Opiinae. In: WHARTON, R.A.; MARSH, P.M.; SHARKEY, M. J. (Ed.). **Manual of the new world genera of the family Braconidae (Hymenoptera)**. Lawrence: Allen Press, 1997a. p. 379-390.

WHARTON, R.A. Generic relationships of Opiinae Braconidae (hymenoptera) parasitic on fruit-infesting Tephritidae (Diptera). **Contributions of the American Entomological Institute**, Ann Arbor, v. 30, n. 3, p.1-53, 1997b.

WHARTON, R.A.; MARSH, PM. New world Opiinae (Hymenoptera: Braconidae) parasitic on Tephritidae (Diptera). **Journal of the Washington Academy of Sciences**, Washington, v. 68, n.4, p. 147-167, 1978.

WHARTON, R.A.; GILSTRAP, F.E. Key to status of Opiinae Braconidae (Hymenoptera) parasitoids used in biological control of *Ceratitis* and *Dacus* s. 1 (Diptera: Tephritidae). **Annual Entomology Society America**, Lanham, v. 76, n. 4, p. 721-741, 1983.

WHITFIELD, J.B.; CAMERON, S.A. Hierarchical analysis of variation in the mitochondrial 16S rRNA gene among Hymenoptera. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 15, n. 12, p.1728–1743, Dec 1998.

WIKIPÉDIA. Desenvolvido pela Wikimedia Foundation. Apresenta conteúdo enciclopédico. Disponível em: <[http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Região Norte do Brasil&oldid=13060744](http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Região%20Norte%20do%20Brasil&oldid=13060744)>. Acesso em: 16 nov. 2008.

WIKIPÉDIA. Desenvolvido pela Wikimedia Foundation. Apresenta conteúdo enciclopédico. Disponível em: <[http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Climas no Brasil&oldid=13111809](http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Climas%20no%20Brasil&oldid=13111809)>. Acesso em: 16 Nov. 2008.

XU, J. N.; QU, F.Y. Ribosomal DNA difference between species A and D of the *Anopheles dirus* complex of mosquitoes from China. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v.11, p. 134-138, Apr 1997.

ZAVIEZO, T.; MILLS, N. Aspects of the biology of *Hyssopus pallidus* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of the codling moth (Lepidoptera: Olethreutidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 28, n. 4, p. 748–754, Aug 1999.

ZIMMER, E.A.; MARTIN, S.L.; BEVERLY, S.M.; KAN, Y.W.; WILSON, A.C. Rapid duplication and loss of genes coding for α chains of hemoglobins. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v.77, p. 2158-2162, 1980.

ZUCCHI, R.A. A taxonomia e o controle biológico de pragas. In: PARRA, J.P.; BOTELHO, P. S.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e predadores**. São Paulo: Editora Manole, 2002. p. 17-24.

http://hymenoptera.tamu.edu/paroffit/?taxcpl=tax&taxcpl_id=7613 Acesso em: 16 out. 2008.

ANEXOS


```

          310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DAGO    T--GT---TGTGTGTTAACAATTTTTATGGCCGATTGAATCGAGTCCCTGAGTTTTTCAAATATATATTTCAAATAGTTAAATTAATTTTTAACCAT
DATO    T--GT---TGTGTGTTAACAATTTTTATGGCCGATTGAATCGAGTCCCTGAGTTTTTCAAATATATATTTCAAATAGTTAAATTAATTTTTAACCAT
DASP    T--GT---TGTGTGTTAACAATTTTTATGGCCGATTGAATCGAGCCCTGAGTTTTTCAAATATATATTTCAAATAGTTAAATTAATTTTTAACCAT
DAAP    T--GTGTTATATGTGTTAACAATTTTTATGGCCGATTGAATCGAGTCTCTGAGTCTTTCAAA-----ATAGTTAAATTAATTTTTAACTAT
DCAP    TTTTGTGTTATATGTGTTGACAATTTTTATGGCCGATTGAATCGAGTCTCTGAGTTTTTCAA-----ATAGTTAAATTAATTTTTAACTAT
DEAP    TTTTATG---GTGTGTTAACAATTTTTATGGCCGATTGAATCGAGTCCCTGAATTTTTCTCA-----AAATAGTTAAATTAATTTTCAACTAT
DETO    TTTTATG---GTGTGTTAACAATTTTTATGGCCGATTGAGTCGAGTCCCTGAATTTTTCTCA-----AAATAGTTAAATTAATTTTCAACTAT
DEGO    TTTTATG---GTGTGTTAACAATTTTTATGGCCGATTGAATCGAGTCCCTGAATTTTTCTCA-----AAATAGTTAAATTAATTTTCAACTAT
Consenso *      *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

          410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DAGO    GAGGATAATATATGAGGACAGATTTTTTAATTGTAATTGCCATAATAATAATAATA---CACCAAATACAACAACAACAACACTTTTTTTTATATTTA
DATO    GAGGATAATATATGAGGACAGATTTTTTAATTGTAATTGCCATAATAATAATAATA---CACCAAATACAACAACAACAACACTTTTTTTTATATTTA
DASP    GAGGATAATATATGAGGACAGATTTTTTAATTGTAATTGCCATAATAATAATAATAAACAACCAAATACAACAACAACAACACTTTTTTTTATATTTA
DAAP    GAGGATA---TATGAGGACAGATTTTTT-AAATTGTAATTGCCATAATAATAATAATA---CACAAACCAACAACAACACTTTTTTTTATATTTA
DCAP    GAGGATA---TATGAGGACAGATTTTTT-AAATTGTAATTGCCATAATAATAATAATAATAACA-ACAAACAACAACAACACTTTTTTTTATATTTA
DEAP    GAGAATA---TATGAGGACAGATTTTTT-AAATTGTAATTGCCATAATAATAACCACATCA-----ACAACAACTTTTTTTATTTTTTTTATATTTA
DETO    GAGAATA---TATGAGGACAGATTTTTT-AAATTGTAATTGCCATAATAATAACCACATCA-----ACAACAACTTTTTTTATTTTTTTTATATTTA
DEGO    GAGAATA---TATGAGGACAGATTTTTT-AAATTGTAATTGCCATAATAATAACCACATCA-----ACAACAACTTTTTTTATTTTTTTTATATTTA
Consenso *** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

          510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DAGO    TAC- GTGTT--GACATGATACTATAATATATTGTAATTGTGTTGGCAC--GAAGAAAACGA-TATAA---CGACGAC-----CTCAGAGT
DATO    TAC- GTGTT--GACATGATACTATAATATATCGTAATTGTGTTGGCAC--GAAGAAAACGA-TATAA---CGACGAC-----CTCAGAGT
DASP    TAC- GTGTT--GACATGATAGTATAATATATTGTAATTGTGTTGGCAC--GAAGAAAACGA-TATAA---CGACGAC-----CTCAGAGT
DAAP    TAC- GTGTT--GACA---TAGTGTAATATATTG-----GTGTGGACAC--GAAGAAAACGA-TATAA---CGACGACG-----ACGACCTCAGAGT
DCAP    TACACGTGTT--GACA---TAGTGTAATATATTGTG---TTGTTGACAC--GAAGATTATGAATATAA---TAACGATAC-AACGACGACCTCAGAGT
DEAP    TACGTGTGTTTTGACATATTGTAATAATATATTGTA-TATTGTCGACACACGAAGAAAATGAATATAAATATTAATTATGACGACGACGACCTCAGAGT
DETO    TACGTGTGTTTTGACATATTGTAATAATATATTGTA-TATTGTCGACACACGAAGAAAATGAATATAAATATTAATTATGACGACGACGACCTCAGAGT
DEGO    TACGTGTGTTTTGACATATTATAATAATATATTGTA-TATTGTCGACACACGAAGAAAATGAATATAAATAACAATTATGACGACGACGACCTCAGAGT
Consenso *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```


	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300

DEAP	TTTAATTTT	TTTAATTTT	AAAAA	-TTAAAGAC	TTTTGGT	TTTTCTGAC	-TGGCTATTT	GGCGGTATT	CGTATGGT	ATTAAAGGCCGCATATTATTAATGT
DEGO	TTTAATTTT	TTTAATTTT	AAAAA	TTAAAGAC	TTTTGGT	TTTTCTGAC	-TGGCTATTT	GGCGGTATT	CGTATGGT	ATTAAAGGCCGCATATTATTAATGT
DETO	TTTAATTTT	TTTAATTTT	AAAAA	TTAAAGAC	TTTTGGT	TTTTCTGAC	-TGGCTATTT	GGCGGTATT	CGTATGGT	ATTAAAGGCCGCATATTATTAATGT
DATO	TTTAATTTT	TTTAATTTT	AAAAA	TTAAAGAC	TTTTGGT	TTTTCTGAC	ATGGCTATTT	GGCGGTATT	CGTATGGT	ATTAAAGGCCGCATATTATTAATAT
DASP	TTTAATTTT	TTTAATTTT	AAAAA	TTAAAGAC	TTTTGGT	TTTTCTGAC	ATGGCTATTT	GGCGGTATT	CGTATGGT	ATTAAAGGCCGCATATTATTAATAT
DAGO	TTTAATTTT	TTTAATTTT	AAAAA	TTAAAGAC	TTTTGGT	TTTTCTGAC	-TGGCTATTT	GGCGGTATT	CGTATGGT	ATTAAAGGCCGCATATTATTAATAT
DAAP	TTTAATTTT	TTTAATTTT	AAAAA	TTAAAGAC	TTTTGGT	TTTTCTGAC	-TGGCTATTT	GGCGGTATT	CGTATGGT	ATTAAAGGCCGCATATTATTAATAT
DCAP	TTTAATTTT	TTTAATTTT	AAAAA	TTAAAGAC	TTTTGGT	TTTTCTGAC	-TGGCTATTT	GGCGGTATT	CGTATGGT	ATTAAAGGCCGCATATTATTAATAT
<i>D.crawfordi</i>	TTTAATTTT	TTTAA	-----	AATTAAGAC	CCCTTAGT	GTTTT	-CTGACC	GACTAACT	CGGCGGTAAAC	CGTATGGTATTAAAGGCCGCATTTTTT-----AT
Consenso	*****	*****	*	*****	*	*****	*	*	*****	*****

	310	320	330	340	350	360	370	380

DEAP	GCGTTCATG	-TCCGTCACAAG	CGGGGTCAATT	CTTTAGTAGT	ATGGACCTAGT	GCCGTCGCTATAACT	TTGATCAGCTGTTAGTTGATAC	
DEGO	GCGTTCATG	-TCCGTCACAAG	CGGGGTCAATT	CTTTAGTAGT	ATGGACCTAGT	GCCGTCGCTATAACT	TTGATCAGCTGTTAGTTGATAC	
DETO	GCGTTCATG	-TCCGTCACAAG	CGGGGTCAATT	CTTTAGTAGT	ATGGACCTAGT	GCCGTCGCTATAACT	TTGATCAGCTGTTAGTTGATAC	
DATO	GCGTTCATA	-TCCGTCACAAG	CGGGGTCAATT	-TTTAGTAGT	ATGGACCTAGT	GCCGTCGCTATAACT	TTGATCAGCTGTTAGTTGATAC	
DASP	GCGTTCATA	-TCCGTCACAAG	CGGGGTCAATT	-TTTAGTAGT	ATGGACCTAGT	GCCGTCGCTATAACT	TTGATCAGCTGTTAGTTGATAC	
DAGO	GCGTTCATA	-TCCGTCACAAG	CGGGGTCAATT	-TTTAGTAGT	ATGGACCTAGT	GCCGTCGCTATAACT	TTGATCAGCTGTTAGTTGATAC	
DAAP	GCGTTCATA	-TCCGTCACAAG	CGGGGTCAATT	-TTTAGTAGT	ATGGACCTAGT	GCCGTCGCTATAACT	TTGATCAGCTGTTAGTTGATAC	
DCAP	GCGTTCATA	-TCCGTCACAAG	CGGGGTCAATT	-TTTAGTAGT	ATGGACCTAGT	GCCGTCGCTATAACT	TTGATCAGCTGTTAGTTGATAC	
<i>D.crawfordi</i>	GCGTTCATA	-TCCGTTGCAAG	CACGATCAATA	-TTTAGTAGT	ACGGACCTAGT	GCCGTCGCTATTATT	CGATCAGCTGTTGGTT-ATAC	
Consenso	*****	*****	*	*****	*	*****	*	*

Alinhamento ClustalW2 das sequências da região do ITS2 de *O. bellus* e *Opius* sp.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
4AAMF1  GTGAATTCTGTGAAC TGCAGGACACATGAACATCGACATTTTGAACGCACATTGCCGTCCACGGATCCAATTTCCCGGACCAAGCCTGGCTGAGGGTCGTT
14DSCF1  GTGAATTCTGTGAAC TGCAGGACACATGAACATCGACATTTTGAACGCACATTGCCGTCCACGGATCCAATTTCCCGGACCAAGCCTGGCTGAGGGTCGTT
5DAMF2  GTGAATTCTGTGAAC TGCAGGACACATGAACATCGACATTTTGAACGCACATTGCCGTCCACGGATCCAATTTCCCGGACCAAGCCTGGCTGAGGGTCGTT
1AAMM1  GTGAATTCTGTGAAC TGCAGGACACATGAACATCGACATTTTGAACGCACATTGCCGTCCACGGATCCAATTTCCCGGACCAAGCCTGGCTGAGGGTCGTT
2BAMM2  GTGAATTCTGTGAAC TGCAGGACACATGAACATCGACATTTTGAACGCACATTGCCGTCCACGGATCCAATTTCCCGGACCAAGCCTGGCTGAGGGTCGTT
7AAPF1  GTGAATTCTGTGAAC TGCAGGACACATGAACATCGACATTTTGAAGCGCACATTGCCGTCCACGGATCCAATTTCCCGGACCAAGCCTGGCTGAGGGTCGTT
8ARNF1  GTGAATTCTGTGAAC TGCAGGACACATGAACATCGACATTTTGAACGCACATTGCCGTCCACGGATCCAATTTCCCGGACCAAGCCTGGCTGAGGGTCGTT
11DTOF1 GTGAATTCTGTGAAC TGCAGGACACATGAACATCGACATTTTGAACGCACATTGCCGTCCACGGATCCAATTTCCCGGACCAAGCCTGGCTGAGGGTCGTT
9DRNF2  GTGAATTCTGTGAAC TGCAGGACACATGAACATCGACATTTTGAACGCACATTGCCGTCCACGGATCCAATTTCCCGGACCAAGCCTGGCTGAGGGTCGTT
15SCSF2 GTGAATTCTGTGAAC TGCAGGACACATGAACATCGACATTTTGAACGCACATTGCCGTCCACGGATCCAATTTCCCGGACCAAGCCTGGCTGAGGGTCGTT
10DRJF1 GTGAATTCTGTGAAC TGCAGGACACATGAACATCGACATTTTGAACGCACATTGCCGTCCACGGATCCAATTTCCCGGACCAAGCCTGGCTGAGGGTCGTT
12DRSF1 GTGAATTCTGTGAAC TGCAGGACACATGAACATCGACATTTTGAACGCACATTGCCGTCCACGGATCCAATTTCCCGGACCAAGCCTGGCTGAGGGTCGTT
3CAMM3  GTGAATTCTGTGAAC TGCAGGACACATGAACATCGACATTTTGAACGCACATTGCCGTCCACGGATCCAATTTCCCGGACCAAGCCTGGCTGAGGGTCGTT
6AAPM1  GTGAATTCTGTGAAC TGCAGGACACATGAACATCGACATTTTGAACGCACATTGCCGTCCACGGATCCAATTTCCCGGACCAAGCCTGGCTGAGGGTCGTT
13CRSF2 GTGAATTCTGTGAAC TGCAGGACACATGAACATCGACATTTTGAACGCACATTGCCGTCCACGGATCCAATTTCCCGGACCAAGCCTGGCTGAGGGTCGTT
Consenso *****

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
4AAMF1  TATATTATAAAAAA CTGCTTATACATATTGCTCCTATTGCTTTTGATAATATTCAATGGGCTTTGTGTATACAAGCGTGT-ATTTATTGTTTAATCATAT
14DSCF1  TATATTATAAAAAA CTGCTTATACATATTGCTCCTATTGCTTTTGATAATATTCAATGGGCTTTGTGTATACAAGCGTGT-ATTTATTGTTTAATCATAT
5DAMF2  TATATTATAAAAAA CTGCTTATACATATTGCTCCTATTGCTTTTGATAATATTCAATGGGCTTTGTGTATACAAGCGTGT-ATTTATTGTTTAATCATAT
1AAMM1  TATATTATAAAAAA CTGCTTATACATATTGCTCCTATTGCTTTTGATAATATTCAATGGGCTTTGTGTATACAAGCGTGT-ATTTATTGTTTAATCATAT
2BAMM2  TATATTATAAAAAA CTGCTTATACATATTGCTCCTATTGCTTTTGATAATATTCAATGGGCTTTGTGTATACAAGCGTGT-ATTTATTGTTTAATCATAT
7AAPF1  TATATTATAAAAAA CTGCTTATACATATTGCTCCTATTGCTTTTGATAATATTCAATGGGCTTTGTGTATACAAGCGTGT-ATTTATTGTTTAATCATAT
8ARNF1  TATATTATAAAAAA CTGCTTATACATATTGCTCCTATTGCTTTTGATAATATTCAATGGGCTTTGTGTATACAAGCGT--ATTTATTGTTTAATCATAT
11DTOF1 TATATTATAAAAAA CTGCTTATACATATTGCTCCTATTGCTTTTGATAATATTCAATGGGCTTTGTGTATACAAGCGT--ATTTATTGTTTAATCATAT
9DRNF2  TATATTATAAAAAA CTGCTTATACATATTGCTCCTATTGCTTTTGATAATATTCAATGGGCTTTGTGTATACAAGCGT--ATTTATTGTTTAATCATAT
15SCSF2 TATATTATAAAAAA CTGCTTATACATATTGCTCCTATTGCTTTTGATAATATTCAATGGGCTTTGTGTATACAAGCGT--ATTTATTGTTTAATCATAT
10DRJF1 TATATTATAAAAAA CTGCTTATACATATTGCTCCTATTGCTTTTGATAATATTCAATGGGCTTTGTGTATACAAGCGT--ATTTATTGTTTAATCATAT
12DRSF1 TATATTATAAAAAA CTGCTTATACATATTGCTCCTATTGCTTTTGATAATATTCAATGGGCTTTGTGTATACAAGCGT--ATTTATTGTTTAATCATAT
3CAMM3  TATATTATAAAAAA CTGCTTATACATATTGCTCCTATTGCTTTTGATAATATTCAATGGGCTTTGTGTATACAAGCGT--ATTTATTGTTTAATCATAT
6AAPM1  TATATTATAAAAAA CTGCTTATACATATTGCTCCTATTGCTTTTGATAATATTCAATGGGCTTTGTGTATACAAGCGT--ATTTATTGTTTAATCATAT
13CRSF2 TATATTATAAAAAA CTGCTTATACATATTGCTCCTATTGCTTTTGATAATATTCAATGGGCTTTGTGTATACAAGCGTGTATTTATTGTTTAATCATAT
Consenso *****

```


	610	620	630	640	650	660	670	680

4AAMF1	AA--AAAT	TCAACTTTAA	TATTAATATTTTTTTT	CAAATTTT	GACGACCT	CAGAGTAGGT	GAGATTACCCCT	TAAATTTAAGCAT
14DSCF1	AA--A--	TCAACTTTAA	TATTAATATTTTTTTT	-CAAA	TTTTGACGACCT	CAGAGTAGGT	GAGATTACCCCT	TAAATTTAAGCAT
5DAMF2	AA--AA-	TCAACTTTAA	TATTAATATTTTTTTT	CAAATTTT	GACGACCT	CAGAGTAGGT	GAGATTACCCCT	TAAATTTAAGCAT
1AAMM1	AA--AA-	TCAACTTTAA	TATTAATATTTTTTTT	CAAATTTT	GACGACCT	CAGAGTAGGT	GAGATTACCCCT	TAAATTTAAGCAT
2BAMM2	AA--AA-	TCAACTTTAA	TATTAATATTTTTTTT	CAAATTTT	GACGACCT	CAGAGTAGGT	GAGATTACCCCT	TAAATTTAAGCAT
7AAPF1	AA--AA-	TCAACTTTAA	TATTAATATTTTTTTT	CAAATTTT	GACGACCT	CAGAGTAGGT	GAGATTACCCCT	TAAATTTAAGCAT
8ARNF1	AA--AA-	TCAACTTTAA	TATTAATATTTTTTTT	CAAATTTT	GACGACCT	CAGAGTAGGT	GAGATTACCCCT	TAAATTTAAGCAT
11DToF1	AA--AA-	TCAACTTTAA	TATTAATATTTTTTTT	CAAATTTT	GACGACCT	CAGAGTAGGT	GAGATTACCCCT	TAAATTTAAGCAT
9DRNF2	AAAAAAAA	TCAACTTTAA	TATTAATATTTTTTTT	CAAATTTT	GACGACCT	CAGAGTAGGT	GAGATTACCCCT	TAAATTTAAGCAT
15CSCF2	AAAAAAAA	TCAACTTTAA	TATTAATATTTTTTTT	CAAATTTT	GACGACCT	CAGAGTAGGT	GAGATTACCCCT	TAAATTTAAGCAT
10DRJF1	AA--CAAT	TCAACTTTAA	TATTAATATTTTTTTT	CAAATTTT	GACGACCT	CAGAGTAGGT	GAGATTACCCCT	TAAATTTAAGCAT
12DRSF1	A---CAAT	TCAACTTTAA	TATTAATATTTTTTTT	CAAATTTT	GACGACCT	CAGAGTAGGT	GAGATTACCCCT	TAAATTTAAGCAT
3Camm3	AAA----	TCAACTTTAA	TATTAATATTTTTTTT	TAA-TTTT	GACGACCT	CAGAGTAGGT	GAGATTACCCCT	TAAATTTAAGCAT
6AAPM1	AA----	TCAACTTTAA	TATTAATATTTTTTTT	TAA-TTTT	GACGACCT	CAGAGTAGGT	GAGATTACCCCT	TAAATTTAAGCAT
13CRSF2	AAAAAA-	TCAACTTTAA	TATTAATATTTTTTTT	TAA-TTTT	GACGACCT	CAGAGTAGGT	GAGATTACCCCT	TAAATTTAAGCAT
Consenso	*	*****	*****	*	*****	*****	*****	*****

Alinhamento ClustalW2 de sequências da região do 28S rDNA D2 de *O. bellus* e *Opius* sp. e sequências depositadas no NCBI.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
7AAPF1    CCTGAGAAA CCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATACATGTTTATGATATAGGTTACTACTTGTAGTATTGCTTGTA
13CRSF2   CCTGAGAAA CCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATACATGTTTATGATATAGGTTACTACTTGTAGTATTGCTTGTA
1AAMM1    CCTGAGAAA CCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATACATGTTTATGATATAGGTTACTACTTGTAGTATTGCTTGTA
2BAMM2    CCTGAGAAA CCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATACATGTTTATGATATAGGTTACTACTTGTAGTATTGCTTGTA
3CAMM3    CCTGAGAAA CCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATACATGTTTATGATATAGGTTACTACTTGTAGTATTGCTTGTA
4AAMF1    CCTGAGAAA CCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATACATGTTTATGATATAGGTTACTACTTGTAGTATTGCTTGTA
5DAMF2    CCTGAGAAA CCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATACATGTTTATGATATAGGTTACTACTTGTAGTATTGCTTGTA
6AAPM1    CCTGAGAAA CCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATACATGTTTATGATATAGGTTACTACTTGTAGTATTGCTTGTA
14DSCF1   CCTGAGAAA CCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATACATGTTTATGATATAGGTTACTACTTGTAGTATTGCTTGTA
15CSCF2   CCTGAGAAA CCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATACATGTTTATGATATAGGTTACTACTTGTAGTATTGCTTGTA
12DRSF1   CCTGAGAAA CCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATACATGTTTATGATATAGGTTACTACTTGTAGTATTGCTTGTA
11DTOF1   CCTGAGAAA CCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATACATGTTTATGATATAGGTTACTACTTGTAGTATTGCTTGTA
10DRJF1   CCTGAGAAA CCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATACATGTTTATGATATAGGTTACTACTTGTAGTATTGCTTGTA
9DRNF2    CCTGAGAAA CCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATACATGTTTATGATATAGGTTACTACTTGTAGTATTGCTTGTA
8ARNF1    CCTGAGAAA CCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATACATGTTTATGATATAGGTTACTACTTGTAGTATTGCTTGTA
O. bellus    CCTGAGAAA CCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATACATGTTTATGATATAGGTTACTACTTGTAGTATTGCTTGTA
O. spretus   CCTGAGAAA CCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATATAAGTT - ATGATATGGGTTACTACTTGTAGTATTGCCTATA
O. fuscipennis CCTGAGAAA CCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATATAAGTT - ATGATATGGGTTACTACTTGTAGTATTGCCTATA
O. dissitus   CCTGAGAAA CCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATATGAGTT - ATGATATGGGTTACTACTTGTAGTATTGCCTATA
O. cingulatus CCTGAGAAA CCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATATGAGTT - ATGATATGGGTTACTACTTGTAGTATTGCCTATA
O. exiguus    CCTGAGAAA CCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATATGAGTT - ATGATATGGGTTACTACTTGTAGTATTGCCTATA
O. basirufus  CCTGAGAAA CCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTTCATCGTCAGCTCATTTTGTATATATACGAGTT - ATGATATGGGTTACTACTTGTAGTATTGCCTATA
Consenso  *****

```

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200

7AAPF1	CATTC	TTGTATATTTT	ATTGCAAGAT	TTGTCGGCGT	-GCAC	TTCTCCCCTAGTAGGAC	GTCCG	GACCCGTTGAG	TGTCGG	TTTACGGCCCAAGTGGTAG
13CRSF2	CATTC	TTGTATATTTT	ATTGCAAGAT	TTGTCGGCGT	-GCAC	TTCTCCCCTAGTAGGAC	GTCCG	GACCCGTTGAG	TGTCGG	TTTACGGCCCAAGTGGTAG
1AAMM1	CATTC	TTGTATATTTT	ATTGCAAGAT	TTGTCGGCGT	-GCAC	TTCTCCCCTAGTAGGAC	GTCCG	GACCCGTTGAG	TGTCGG	TTTACGGCCCAAGTGGTAG
2BAMM2	CATTC	TTGTATATTTT	ATTGCAAGAT	TTGTCGGCGT	-GCAC	TTCTCCCCTAGTAGGAC	GTCCG	GACCCGTTGAG	TGTCGG	TTTACGGCCCAAGTGGTAG
3CAMM3	CATTC	TTGTATATTTT	ATTGCAAGAT	TTGTCGGCGT	-GCAC	TTCTCCCCTAGTAGGAC	GTCCG	GACCCGTTGAG	TGTCGG	TTTACGGCCCAAGTGGTAG
4AAMF1	CATTC	TTGTATATTTT	ATTGCAAGAT	TTGTCGGCGT	-GCAC	TTCTCCCCTAGTAGGAC	GTCCG	GACCCGTTGAG	TGTCGG	TTTACGGCCCAAGTGGTAG
5DAMF2	CATTC	TTGTATATTTT	ATTGCAAGAT	TTGTCGGCGT	-GCAC	TTCTCCCCTAGTAGGAC	GTCCG	GACCCGTTGAG	TGTCGG	TTTACGGCCCAAGTGGTAG
6AAPM1	CATTC	TTGTATATTTT	ATTGCAAGAT	TTGTCGGCGT	-GCAC	TTCTCCCCTAGTAGGAC	GTCCG	GACCCGTTGAG	TGTCGG	TTTACGGCCCAAGTGGTAG
14DSCF1	CATTC	TTGTATATTTT	ATTGCAAGAT	TTGTCGGCGT	-GCAC	TTCTCCCCTAGTAGGAC	GTCCG	GACCCGTTGAG	TGTCGG	TTTACGGCCCAAGTGGTAG
15CSCF2	CATTC	TTGTATATTTT	ATTGCAAGAT	TTGTCGGCGT	-GCAC	TTCTCCCCTAGTAGGAC	GTCCG	GACCCGTTGAG	TGTCGG	TTTACGGCCCAAGTGGTAG
12DRSF1	CATTC	TTGTATATTTT	ATTGCAAGAT	TTGTCGGCGT	-GCAC	TTCTCCCCTAGTAGGAC	GTCCG	GACCCGTTGAG	TGTCGG	TTTACGGCCCAAGTGGTAG
11DToF1	CATTC	TTGTATATTTT	ATTGCAAGAT	TTGTCGGCGT	-GCAC	TTCTCCCCTAGTAGGAC	GTCCG	GACCCGTTGAG	TGTCGG	TTTACGGCCCAAGTGGTAG
10DRJF1	CATTC	TTGTATATTTT	ATTGCAAGAT	TTGTCGGCGT	-GCAC	TTCTCCCCTAGTAGGAC	GTCCG	GACCCGTTGAG	TGTCGG	TTTACGGCCCAAGTGGTAG
9DRNF2	CATTC	TTGTATATTTT	ATTGCAAGAT	TTGTCGGCGT	-GCAC	TTCTCCCCTAGTAGGAC	GTCCG	GACCCGTTGAG	TGTCGG	TTTACGGCCCAAGTGGTAG
8ARNF1	CATTC	TTGTATATTTT	ATTGCAAGAT	TTGTCGGCGT	-GCAC	TTCTCCCCTAGTAGGAC	GTCCG	GACCCGTTGAG	TGTCGG	TTTACGGCCCAAGTGGTAG
<i>O. bellus</i>	CATTC	TTGTATATTTT	ATTGCAAGAT	TTGTCGGCGT	-GCAC	TTCTCCCCTAGTAGGAC	GTCCG	GACCCGTTGAG	TGTCGG	TTTACGGCCCAAGTGGTAG
<i>O. spretus</i>	CATTC	TTGTATATTTT	ATTGCAAGAT	TTGTCGGCGT	-GCAC	TTCTCCCCTAGTAGGAC	GTCCG	GACCCGTTGAG	TGTCGG	TCTACGGCCCGAGTGGTAG
<i>O. fuscipennis</i>	CATTC	TTATATATTTA	AATTGCAAGAT	TTGTCGGCGT	-GCAC	TTCTCCCCTAGTAGGAC	GTCCG	GACCCGTTGAG	TGTCGG	TCTACGGCCCGAGTGGTAG
<i>O. dissitus</i>	CATTC	TTATATATTTA	AATTGCAAGAT	TTGTCGGCGT	-GCAC	TTCTCCCCTAGTAGGAC	GTCCG	GACCCGTTGAG	TGTCGG	TCTACGGCCCGAGTGGTAG
<i>O. cingulatus</i>	CATTC	TTATATATTTT	ATTGCAAGAT	TTGTCGGCGT	-GCAC	TTCTCCCCTAGTAGGAC	GTCCG	GACCCGTTGAG	TGTCGG	TCTACGGCCCGAGTGGTAG
<i>O. exiguus</i>	CATTC	TTGTATATTTT	ATTGCAAGAT	TTGTCGGCGT	-GCAC	TTCTCCCCTAGTAGGAC	GTCCG	GACCCGTTGAG	TGTCGG	TCTACGGCCCAAGTGGTAG
<i>O. basirufus</i>	CATTC	TTGTATATTTT	ATTGCAAGAT	TTGTCGGCGT	-GCAC	TTCTCCCCTAGTAGGAC	GTCCG	GACCCGTTGAG	TGTCGG	TCTACGGCCCGAGTGGTAG
Consenso	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****

	410	420	430
		
7AAPF1	TTAAATACCG	TCAGCGATGCTACTGCTTTG	
13CRSF2	TTAAATACCG	TCAGCGATGCTACTGCTTTG	
1AAMM1	TTAAATACCG	TCAGCGATGCTACTGCTTTG	
2BAMM2	TTAAATACCG	TCAGCGATGCTACTGCTTTG	
3CMM3	TTAAATACCG	TCAGCGATGCTACTGCTTTG	
4AAMF1	TTAAATACCG	TCAGCGATGCTACTGCTTTG	
5DAMF2	TTAAATACCG	TCAGCGATGCTACTGCTTTG	
6AAPM1	TTAAATACCG	TCAGCGATGCTACTGCTTTG	
14DSCF1	TTAAATACCG	TCAGCGATGCTACTGCTTTG	
15CSCF2	TTAAATACCG	TCAGCGATGCTACTGCTTTG	
12DRSF1	TTAAATACCG	TCAGCGATGCTACTGCTTTG	
11DToF1	TTAAATACCG	TCAGCGATGCTACTGCTTTG	
10DRJF1	TTAAATACCG	TCAGCGATGCTACTGCTTTG	
9DRNF2	TTAAATACCG	TCAGCGATGCTACTGCTTTG	
8ARNF1	TTAAATACCG	TCAGCGATGCTACTGCTTTG	
<i>O. bellus</i>	TTAAATACCGG	TCAGCGATGCTACTGCTTTG	
<i>O. spretus</i>	-TATATACCGG	TCTGCGATGCTACTGCTTTG	
<i>O. fuscipennis</i>	-CATATACCGG	TCTGCGATGCTACTGCTTTG	
<i>O. dissitus</i>	TAATATACCGG	TCTGCGATGCTACTGCTTTG	
<i>O. cingulatus</i>	--ATATACCGG	TCTGCGATGCTACTGCTTTG	
<i>O. exiguus</i>	--ATATACCGG	TCTGCGATGCTACTGCTTTG	
<i>O. basirufus</i>	--ACATACCGG	TCTGCGATGCTACTGCTTTG	
Consenso	* * * * *	* * * * *	* * * * *

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)