

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E GENÉTICA DE ESPÉCIES DE
Liriomyza (DIPTERA: AGROMYZIDAE) ASSOCIADAS COM HORTALIÇAS

por

KARLA DIANA DA SILVA SOMBRA

(Sob Orientação do Professor Valdir de Queiroz Balbino - UFPE)

RESUMO

A ordem Diptera destaca-se por possuir insetos com hábito alimentar do tipo minador, onde a principal família com essa característica é Agromyzidae, representada principalmente nos gêneros *Liriomyza* e *Agromyza*. *Liriomyza trifolii* Burgess, *Liriomyza sativae* Blanchard e *Liriomyza huidobrensis* Blanchard apresentam importância econômica, pois são pragas cosmopolitas de plantas ornamentais e de várias culturas. Existe uma notável similaridade morfológica entre as espécies que compõem o gênero *Liriomyza*, onde a identificação precisa e o conhecimento da variabilidade genética são passos importantes em programas de controle. Os objetivos deste estudo foram confirmar o status taxonômico e conhecer a variabilidade de populações de *Liriomyza* localizadas no Brasil e no México através de uma abordagem integrativa, combinando análises morfológicas, morfométricas, moleculares e estruturação genética através do marcador COX I. As espécies foram identificadas como *Liriomyza commelinae* Frost, *L. trifolii* e *L. sativae*. Uma árvore filogenética de Neighbor-Joining mostrou a presença de três clados, separando bem as espécies. Foi possível observar que o valor do índice de fixação F_{ST} foi alto entre populações de *L. sativae* e moderado entre as de *L. trifolii*. Detectou-se a presença de 8 haplótipos para *L. sativae*, onde o H8 foi o mais frequente. Nas populações de *L.*

trifolii foi detectado a presença de 10 haplótipos, sendo o H1 o mais frequente. Uma árvore filogenética foi gerada para *L. sativae* e *L. trifolii* através da análise de Neighbor-Joining mostrando a influência que o hospedeiro tem sobre a espécie. Nas populações do Brasil foi possível observar que o valor do índice de fixação F_{ST} foi baixo. Presença de 14 haplótipos onde o H1 foi o mais frequente com 81 indivíduos distribuídos entre as sete populações. O método de máxima verossimilhança e de Neighbor-Joining, apresentaram a presença de um único clado para *L. sativae*, sendo demonstrando elevado grau de similaridade genética.

PALAVRAS-CHAVES: Mosca minadora, taxonomia, morfometria, marcador molecular, citocromo oxidase I.

MORPHOLOGICAL, MORPHOMETRIC AND GENETICS CHARACTERISTICS SPECIES OF

Liriomyza (Diptera: Agromyzidae) ASSOCIATED WITH VEGETABLES

by

KARLA DIANA DA SILVA SOMBRA

(Under the Direction of Professor Valdir de Queiroz Balbino - UFPE)

ABSTRACT

The order Diptera stands out for having insects with food habit miner type, where the main family with this feature is Agromyzidae mainly represented in *Liriomyza* and *Agromyza* genres. *Liriomyza trifolii*, Burgess *L. sativae* Blanchard and *L. huidobrensis* Blanchard present economic importance, they are cosmopolitan pest of ornamental plants and various cultures. There is a remarkable morphological similarity among the species that comprise the genus *Liriomyza*, where the precise identification and knowledge of genetic variability are important steps in control programs. The objectives of this study were to confirm the taxonomic status and meet the variability of *Liriomyza* populations located in Brazil and Mexico through an integrative approach, combining morphological, morphometric, molecular and genetic structure through marker COX I. The species were identified as *L. commelinae*, *L. trifolii* and *L. sativae*. A phylogenetic neighbor-joining tree showed the presence of three clades and separating the species. It was observed that the value of the F_{ST} fixation rate was high among the populations of *L. sativae*, moderate between *L. trifolii*. The presence of *L. sativae* to 8 haplotypes where the H8 was the most common was detected. In populations of *L. trifolii* it was found to contain 10 haplotypes, H1 being the most common. A phylogenetic tree was generated for *L. sativae* and *L. trifolii* through the Neighbor-Joining analysis showing the influence that the host has on the species. In

populations of Brazil was observed that the value of the F_{ST} fixation index was low. Presence of 14 haplotypes where the H1 was the most frequent with 81 individuals distributed among the seven populations. The maximum likelihood method and Neighbor-Joining showed the presence of a single clade to *L. sativae*, and demonstrating high degree of genetic similarity.

KEY WORDS: Leafminer, taxonomy, morphometry, molecular marker, cytochrome oxidase I.

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E GENÉTICA DE ESPÉCIES DE
Liriomyza (DIPTERA: AGROMYZIDAE) ASSOCIADAS COM HORTALIÇAS

por

KARLA DIANA DA SILVA SOMBRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Entomologia Agrícola.

RECIFE - PE

Julho – 2016

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E GENÉTICA DE ESPÉCIES DE
Liriomyza (DIPTERA: AGROMYZIDAE) ASSOCIADAS COM HORTALIÇAS

por

KARLA DIANA DA SILVA SOMBRA

Comitê de Orientação:

Valdir de Queiroz Balbino – UFPE

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E GENÉTICA DE ESPÉCIES DE
Liriomyza (DIPTERA: AGROMYZIDAE) ASSOCIADAS COM HORTALIÇAS.

por

KARLA DIANA DA SILVA SOMBRA

Orientador:

Valdir de Queiroz Balbino – UFPE

Examinadores:

Elton Lucio de Araujo – UFERSA

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

Carlos Alberto Santiago Figueiredo Júnior – UFPE

Heidi Lacerda Alves da Cruz – UFPE

AULA DE VOO

“O conhecimento
caminha lento feito lagarta.
Primeiro não sabe que sabe
e voraz contenta-se com o cotidiano orvalho.

Depois pensa que sabe
e se fecha em si mesmo:
faz muralhas,
cava trincheiras,
ergue barricadas.
Defendendo o que pensa saber
levanta certezas na forma de muro,
orgulhando-se de seu casulo.

Até que maduro
explode em vôos
rindo do tempo que imaginava saber
ou guardava preso o que sabia.
Voa alto sua ousadia
reconhecendo o suor dos séculos
no orvalho de cada dia.

Mesmo o vôo mais belo
descobre um dia não ser eterno.
É tempo de acasalar:
voltar à terra com seus ovos
à espera de novas e prosaicas lagartas.

O conhecimento é assim:
ri de si mesmo
e de suas certezas
É meta da forma
metamorfose
movimento
fluir do tempo
que tanto cria como arrasa
a nos mostrar que para o vôo
é preciso tanto o casulo
como a asa.”

Mauro Luis Iasi

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Francisco Nailton Gomes Sombra e Ana Maria da Silva Sombra, pelos ensinamentos, apoio e incentivo. Às minhas irmãs, Diana Sombra e Daiana Sombra pela amizade, companheirismo e cumplicidade. Ao meu amado e querido sobrinho/afilhado Luiz Gustavo Sombra, por me lembrar a cada vez que o vejo o quanto a vida passa rápido e que temos que aproveitar cada minuto, principalmente ao lado das pessoas que amamos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar comigo em todos os momentos, me dando forças para eu alcançar os meus objetivos e realizar um sonho muito almejado.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia Agrícola, pela oportunidade de realizar este curso.

Ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador, professor Valdir Balbino, pelo apoio e ensinamentos acadêmicos transmitidos.

Aos meus coorientador, professor Herbert Álvaro Abreu de Siqueira, pelas valiosas sugestões.

Ao professor Elton Lucio de Araujo por ter me concedido a oportunidade de trabalhar com Entomologia, além da amizade de anos.

Aos professores Doutores Néstor Bautista, Rogelio Palacios e Fernando Valenzuela que sempre estiveram dispostos a me ajudarem em meus experimentos no México;

Aos amigos do Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva – LABBE, Lidiane Gomes, Klaúdia Tenório, César Costa Jr., Marcos Regueira, Carlos Figueiredo Júnior, Sérgio de Paiva Júnior, Lucas de Paula, Bruno Sampaio, Wilson Silva Jr., Fabiana Pereira, Bandeira Jr., Éllen Oliveira, Helena Alves, Heidi Lacerda, Tadeu Cruz, Érika Mousinho, Cida pela ajuda e acolhimento.

Ao doutorando Moisés Freitas pela atenção, ensinamento, paciência e a grande colaboração intelectual que ajudou nesse trabalho.

Aos amigos de república, Clara Marques, Carlos Henrique Nogueira, Paolo Augustus, Márcia Mayara, Douglas Raphael, Alice Sutana, Alice Nabica, Thamara Rubia, pela ótima parceria, receptividade e convívio.

Aos amigos do PPGEA/UFRPE e a todos os outros com quem tive um ótimo convívio.

Aos amigos Thiago Alves, Clara Marques, Carlos Henrique Nogueira, Thiago Azevedo, Vitor Zuim, Cecília Sanguinette, especialmente pela amizade e carinho.

Ao meu grande e querido amigo Luiz Alberto Flores Cruz por todo carinho, atenção, apoio e paciência a mim dedicado tanto quando eu estava no México como aqui no Brasil.

A minha amiga, irmã e companheira de todas as hora e momentos Kamila Câmara, meus agradecimentos pelo companheirismo, cumplicidade, amizade... tantas lembranças.

SUMÁRIO

	Páginas
AGRADECIMENTOS	x
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
Minadores de folhas	2
Generalidades da família Agromyzidae	2
Gêneros de Agromyzidae	3
Espécies de <i>Liriomyza</i> Milk	3
Espécies de <i>Liriomyza</i> Milk de importância econômica.....	4
Generalidades sobre as moscas minadoras.....	7
Plantas hospedeiras	10
Dificuldades de identificação morfológica	10
Complexos de espécies crípticas	11
Morfometria geométrica.....	12
DNA Mitocondrial	15
Marcadores moleculares.....	16
DNA <i>Barcode</i>	18
Genética de populações.....	19
LITERATURA CITADA.....	20
2 TAXONOMIA INTEGRATIVA APLICADA A POPULAÇÕES MEXICANAS DE <i>Liriomyza</i> (DIPTERA: AGROMYZIDAE).....	31

RESUMO	32
ABSTRACT	33
INTRODUÇÃO	34
MATERIAL E MÉTODOS	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
LITERATURA CITADA.....	51
3 ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES ALOPÁTRICAS DE <i>Liriomyza</i> <i>sativae</i> (BLANCHARD) (DIPTERA: AGROMYZIDAE) DO BRASIL E MÉXICO	78
RESUMO	79
ABSTRACT	80
INTRODUÇÃO	81
MATERIAL E MÉTODOS	82
RESULTADOS.....	84
DISCUSSÃO.....	86
LITERATURA CITADA.....	88
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	96

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A diversidade dos seres vivos é um dos aspectos mais intrigantes do nosso planeta e o conhecimento do número de espécies que formam tal diversidade está entre as questões fundamentais a serem respondidas pela ciência (Tosevski *et al.* 2014). Estima-se que existam 1.233.500 de espécies catalogadas, onde grande parte desta é composta somente por insetos, cerca de 925.000. A taxonomia é a ciência dedicada a descobrir, descrever, nomear e examinar as relações de parentesco entre as espécies, assim como outros táxons (Tosevski *et al.* 2014).

Desde o advento da nomenclatura Linneana em 1758, taxonomistas têm descrito e nomeado centenas de espécies (aproximadamente 20.000 por ano), fundamentadas principalmente na taxonomia tradicional, ou seja, aquela baseada na comparação de caracteres morfológicos. Entretanto, a taxonomia tradicional esbarra em algumas limitações como: a dificuldade na identificação de espécies crípticas ou mesmo naquelas que apresentam larga plasticidade fenotípica, o que muitas vezes acarretam em identificações errôneas. Tais erros de identificação têm importante impacto, principalmente quando relacionados às questões fitossanitárias (Bhuiya *et al.* 2010)

Somado a isto, existe ainda a falta de interesse dos estudantes e o baixo investimento na linha da pesquisa taxonômica, tendo como consequência a redução de especialistas em muitos grupos. Com o advento de novas tecnologias e o com o avanço da computação, novos métodos de investigação surgiram como forma de contornar tais dificuldades, como por exemplo, a utilização do DNA-barcode. A taxonomia integrativa propõe uma aproximação de ferramentas utilizadas em marcadores moleculares (DNA nuclear e/ou mtDNA), caracteres ecológicos e caracteres

morfológicos afim de auxiliar na identificação da biodiversidade global. No entanto, algumas destas ferramentas têm recebido críticas por alguns taxonomistas.

Minadores de folhas

O gênero *Liriomyza* contém mais de 330 espécies que estão amplamente distribuídas no novo e velho mundo, e são comumente encontradas em regiões tropicais e temperadas, onde aproximadamente 23 espécies de *Liriomyza* são relatadas como de importância econômica e cinco delas são polífagas (Spencer 1973, Parrella 1987, Petcharat *et al.* 2002, Asadi *et al.* 2006).

As moscas minadoras causam danos diretos e indiretos a uma ampla variedade de cultivares e ornamentais, isto se manifesta através das puncturas de alimentação e oviposição feitas pelas fêmeas adultas, como também pela atividade alimentar das larvas nas folhas, destruindo parte da massa foliar e diminuindo em alguns casos a atividade fotossintética (Musgrave 1975, Palacios *et al.* 2008, Liu *et al.* 2009).

Estes insetos têm invadido muitas regiões do mundo, além dos centros de origem, como por exemplo *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard), *Liriomyza trifolii* (Burgess) e *Liriomyza sativae* Blanchard, são três das espécies de Agromyzidae consideradas como pragas de importância econômica em diversos cultivos agrícolas e ornamentais (Martinez e Étienne 2002, Petcharat *et al.* 2002). Os métodos de controle como físico, cultural, mecânico e químico tem demonstrado limitações para a biologia destes insetos. A mudança de status das moscas minadoras como praga, é um resultado em parte da sua natureza multivoltina, hábitos de alimentação polífagas e habilidade para desenvolver resistência muito mais rápida aos inseticidas (Carpinera 2001).

Generalidades da família Agromyzidae

O hábito minador dos insetos, foi relatado pela primeira vez na literatura desde o final do século XVII, quando Beckmann em 1681, relatou e ilustrou as formas estranhas que apareceram

nos anos anteriores em grandes quantidades em arvores de cereja em Frakfurt, Alemanha. Esses insetos eram espécies de minadores da ordem Lepidoptera. Cinquenta anos depois, Réaumur em 1737, fez o primeiro registro de minadores agromizideos sobre plantas de *Sonchus oleraceus* L., *Trifolium* sp., *Ranunculus* sp. e *Lonicera* sp. (Spencer 1973).

A família Agromyzidae inclui importantes espécies de dípteros minadores, com sua origem datada no Paleoceno através de informações obtidas a partir de icnofósseis da região sudeste do Montana (EUA) (Winkler *et al.* 2010). Contendo aproximadamente 2.500 espécies, sendo moscas de tamanho pequeno a mediano (2 – 6 mm) (Spencer 1973, Lamkin *et al.* 2008). As cores predominantes em adultos são pretas, cinzas, verdes a completamente amarelas e suas asas são hialinas (Spencer 1973, Gencer 2009).

Esta família é constituída por espécies fitófagas, onde as larvas vivem e se alimentam inteiramente dentro dos tecidos da planta hospedeira. Cerca de 75% das espécies em estado larval, têm o hábito de se alimentar do tecido mesófilar sem danificar a epiderme da folha, por que são conhecidos comumente como “minadores” “submarinos” (Salvo & Valladares 2007).

O restante dos agromyzideos, de igual modo alimenta-se como endófagos em vários órgãos da planta, tais como hastes, ramos e inflorescências, causando injúrias às plantas ao ocasionar desfolha, redução do teor de açúcar dos frutos (Brix), diminuição na produção ou até mesmo a morte das plantas quando ocorre altas densidades de infestação (Spencer & Steyskal 1986, Reitz & Trumble 2002, Gencer 2004, 2009).

A maioria dos autores concorda que uma espécie de mosca minadora se converte em praga por causa do desenvolvimento de resistência a inseticidas e pela eliminação dos inimigos naturais (Salvo & Valladares 2007). Além do mais, esses dois fatores podem contribuir decisivamente para que os agromyzideos alcancem tamanhos populacionais elevados, permitindo-lhes passar despercebidos até atingir altas densidades e a proteção que recebem seus estados imaturos (larvas)

que estão dentro de tecidos vegetais, especialmente contra inseticidas de contato (Reitz & Trumble 2002).

Gêneros de Agromyzidae

A família Agromyzidae se divide em duas subfamílias, a Agromyzinae, que compreende sete gêneros, e a Phytomyzinae com dezoito gêneros; entre estes últimos, um gênero economicamente muito importante é o *Liriomyza* Milk, o qual está amplamente distribuído no mundo e é composto por espécies polífagas (Palacios *et al.* 2008)

Espécies de *Liriomyza* Milk.

O gênero *Liriomyza* foi reconhecido em 1894. É um grupo cosmopolita que contém mais de 300 espécies, distribuídas extensamente, sendo melhor adaptadas às regiões temperadas (Spencer 1973, Petcharat 2002, Asadi *et al.* 2006). Existem relativamente poucas espécies nos trópicos. Dentro deste gênero existem 23 espécies economicamente importantes que causam injúrias às culturas agrícolas e plantas ornamentais por sua atividade de minar folhas. Das 2.450 espécies descritas na família Agromyzidae, apenas 11 são consideradas polífagas e cinco destas se encontram dentro do gênero *Liriomyza* (Parrella 1987). As larvas deste gênero atacam plantas ornamentais e cultivos agrícolas das famílias Cucurbitaceae, Fabaceae, Solanaceae, Brassicaceae, Asteraceae e outras espécies de plantas (Musgrave *et al.* 1975, Petcharat 2002).

Espécies de *Liriomyza* Milk. de importância econômica

A nível mundial se tem registrado várias espécies de minadores de folhas pertencentes ao gênero *Liriomyza*, as quais atacam as plantas silvestres e cultivadas, por exemplo, na região baixa

de Rio Grande Valle do Texas e outras regiões dos Estados Unidos e México, se relata a *L. sativae* (Blanchard) como uma séria praga em pimenta (Chandler 1984).

Enquanto que *L. trifolii* (Burgess) é indicada como a praga de maior importância econômica em aipo (*Apium graveolens* L.) e tomate (*S. lycopersicon*) na Flórida, e representa uma séria ameaça como praga aos cultivos de crisântemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) (Parrella 1984). Indica-se que para os cultivos hortícolas em campo a nível mundial são elevadas as ameaças de três espécies de minadores e entre elas, *L. sativae*, *L. trifolii* e *L. huidobrensis* (Blanchard), as quais se caracterizam por serem altamente polífagas e por invadir novas áreas geográficas, incluindo grandes extensões do Velho Mundo (Murphy & La Salle 1999). Essas três espécies são relatadas como os agromyziideos mais comuns e importantes em diferentes cultivos nas zonas produtoras da Califórnia (Reitz & Trumble 2002).

Na província de Hainan, China, foi observada a presença de *L. sativae* em 1994 e rapidamente se disseminou por todo o território, exceto em algumas áreas, gerando um sério problema na produção agrícola (Xu *et al.* 2007). Em Shizuoka, Japão, *L. trifolii* foi relatada pela primeira vez em 1990, atacando cultivos e plantas ornamentais (Abe & Konishi 2004). O dano é causado pelas larvas que se comportam como pragas polífagas (Petcharat *et al.* 2002). Por exemplo, na Turquia (Gencer 2004) observou-se que *L. trifolii* ataca feijão *Phaseolus vulgaris* L., tomate *S. lycopersicon* e abóbora *Cucurbita pepo* L.

Foram relatadas espécies diferentes como *L. katoi* Sasakawa e *L. yasumatsui* Sasakawa sobre *Chrysanthemum* sp. no norte da Indonésia (Malipatil *et al.* 2004). Assim também Téllez *et al.* 2005 relatam *L. trifolii* e *L. bryoniae* (Kaltenbach) atualmente essas espécies estão presentes em cultivos de hortícolas de Almería, Espanha.

Enquanto que no Canadá se menciona como minador da ervilha *L. huidobrensis*, no qual em princípio foi encontrado e identificado em Pântano na Holanda pertencente a região de

Ontario em 1999 e desde então causas perdas econômicas significativas em cultivos vegetais de folhas tais como alface *Lactuca sativa* L. (Asteraceae), espinafre *Spinaceae oleracea* L. (Amaranthaceae), aipo *A. graveolens* e em casa de vegetação ataca a plantas ornamentais, assim como, pepino *Cucumis sativus* L. (Cucurbitaceae) e cebola *Allium cepa* L. (Alliaceae) (Martin *et al.* 2005).

Espécies de *L. strigata* (Meigen) são relatadas atacando *Cerithe minor* L. (Boraginaceae) e *L. cicerina* (Rondani) a qual ataca grão de bico *Cicer arietinum* L. (Fabaceae) que junto com *L. trifolii* é relatado atacando a *Cardaria draba* L. (Brassicaceae), as quais tornaram-se um complexo de agromicidas de importância econômica na Turquia (Grencer 2009).

Com relação ao México e, sobretudo a região central do país Palacios *et al.* (2008) mencionam três espécies identificadas: *L. brassicae* (Riley) encontrada sobre a planta ornamental de latana *Latana câmara* L. (Verbenaceae), *L. sabaziae* Spencer, atacando cártamo *Carthamus tinctorius* L. (Asteraceae) e *L. trifolii* espécie localizada atacando pimenta *C. annuum* L. (Solanaceae) e especificamente na região produtora de crisântemo em Texcoco, Estado do México, são documentadas as três espécies de minadores comumente relatadas na literatura científica como as que causam mais danos a nível mundial, tais como *L. trifolii*, *L. huidobrensis* e *L. sativae*, sendo esta última a mais comum e dominante (Hernández *et al.* 2009).

No Brasil, as espécies *L. trifolii*, *L. sativae* e *L. huidobrensis* apresentam importância econômica e ocorrem naturalmente em quase todos os estados, infestando cerca de 14 famílias de plantas, principalmente Solanaceae, Cucurbitaceae, Asteraceae e Fabaceae. No Brasil o primeiro registro de *L. sativae* (como *L. guytona*) foi na década de 1960, no estado de São Paulo (Nakano 1967). Segundo Fernandes (2004), a mosca minadora há bastante tempo é uma praga importante nas áreas onde é cultivado o meloeiro no Nordeste.

Os Estados do Rio Grande do Norte, Ceará e Bahia são responsáveis por 94% da produção nacional de melão. No entanto, devido ao ataque da mosca minadora, já foram detectadas perdas de até 40% da produção (Fernandes 2004). Segundo Araujo e colaboradores (2007), essa praga deve ser considerada como o principal entrave para o cultivo do meloeiro na atualidade, sendo preocupação constante em todas as áreas produtoras.

No entanto, é possível que a distribuição das moscas minadoras no Brasil seja bem mais abrangente do que está documentado, devido principalmente à escassez de taxonomistas especializados nesse grupo de insetos. Esse fato dificulta a realização de estudos de levantamento e de flutuação populacional, ações estas fundamentais para o melhor conhecimento e manejo do inseto (Lima 2012).

Generalidades sobre as moscas minadoras

Liriomyza huidobrensis é nativa da América do Sul, encontrada em países como Peru, Chile e Argentina, mas dispersa em quase todo mundo adaptando-se a novas regiões geográficas e afetando economicamente as produções comerciais de diversas hortaliças, espécies ornamentais e cultivos anuais. Na América do Norte se encontra no México, Califórnia e Hawaii, ocasionalmente na Flórida, sendo que ultimamente se encontra em vários países Europeus, Asiáticos e alguns da África (Larraín 2004).

As fêmeas do minador de *L. huidobrensis*, depositam em média 252 ovos, abaixo da epiderme das folhas (Lizárraga 1990). Poucos dias depois ocorre a eclosão das larvas que se alimentam próximo das nervuras das folhas realizando galerias (ou minas), as quais vão aumentando de tamanho conforme a larva cresce. Ao completar seu desenvolvimento, a larva sai da mina para empupar, o qual acontece sobre as folhas ou no solo.

A duração de cada fase desse inseto depende da temperatura, umidade relativa, hospedeiros e manejo do cultivo. Sendo a temperatura o fator mais importante e as faixas ótimas são 20°C aos 27°C (Trouvé *et al.* 1991). A umidade prolongada afeta negativamente o ciclo de vida destes insetos principalmente as pupas em solos húmidos. A maior atividade desta praga ocorre em horas de pouca luminosidade (5-6 am e 4-6pm), a uma temperatura de 27°C e 74% de umidade relativa, com duração de ciclo de 22.5 dias (Trouvé *et al.* 1991).

Liriomyza trifolii é nativa dos Estados Unidos da América, mas amplamente distribuída a nível mundial, até agora foram relatados em países Europeus como, Checoslovaquia, França, Alemanha, Itália, Polónia, Espanha, Inglaterra e outros. Na Ásia é registrado e relatado no Japão, enquanto que em países Africanos se mencionam a Etiópia, Nigéria, Senegal e Tanzânia. No continente Americano está relatada no Canadá, México, Bahamas, Costa Rica, República Dominicana, Guadalupe, Colômbia, Peru, Venezuela e Estados Unidos (Étinne & Martínez 1996).

A máxima emergência dos adultos ocorre antes do meio dia, sendo que os machos emergem primeiro que as fêmeas, onde o acasalamento pode ocorrer 24 horas depois da emergência e uma só cópula é suficiente para fertilizar todos os ovos. Debeke *et al.* (2007) mencionam que depois da cópula, a fêmea faz puncturas nas folhas do hospedeiro provocando feridas que servem para ovipositar, como também fazer puncturas de alimentação, em ambos os casos utiliza seu ovipositor.

As puncturas para alimentação causam a destruição de um maior número de células e são mais fáceis de se observar a olho nu, aproximadamente 15% destas são para colocar ovos, mesmo os que estão localizados abaixo da superfície das folhas, a quantidade varia de acordo com a temperatura e planta hospedeira. Os machos são incapazes de provocar essa injúria nas plantas, mas se tem observado que se alimentam das feridas feitas pelas fêmeas (Murphy & LaSalle 1999).

Os adultos vivem aproximadamente entre 13 e 18 dias, embora os machos apenas 2 a 3 dias, possivelmente por que eles se alimentam menos que as fêmeas por sua limitação de gerar as puncturas nos tecidos vegetais, enquanto que as fêmeas geralmente sobrevivem durante uma semana, onde se alimentam e ovipositam durante a maior parte das horas de luz do dia, sobretudo ao meio dia (Capineira 2001).

Os ovos são de forma ovalada e pequenos, medem aproximadamente 1mm de largura e 0.2 mm de altura, inicialmente são claros translúcidos e posteriormente se tornam grisáceos, de preferência são depositados na parte media da planta, tanto na parte adaxial como abaxial das folhas, o adulto parece evitar as folhas imaturas, a fêmea deposita os ovos sobre a superfície inferior da folha justo abaixo da epiderme (Parrella 1987).

Para os três instares larvais, seu pico de desenvolvimento atinge um comprimento de aproximadamente 2.25mm onde no início as larvas são incolores, depois se transformam em esverdeada e por último amarelo (Parrella 1987). Apresenta um esqueleto cefalofaríngeal evidente em todos os instares, a larva faz um corte semicircular na folha, na epiderme superior da mesma, local em que emerge a mina e justamente antes da formação do pupário, já no solo ela se enterra como no máximo 1 cm de profundidade para formar o pupário, sendo que existe um quarto instar larval que ocorre entre a formação do pupário e a pupa, embora esse processo seja ignorado pelos pesquisadores (Parrella 1987).

A alimentação da larva se inicia logo após sua emergência, sendo que diferentes espécies se alimentam de diversas partes do mesófilo foliar, por exemplo, *L. trifolii* consome o parênquima foliar, *L. huidobrensis* se alimenta do mesófilo esponjoso e *L. brassicae* se alimenta de ambos (Parrella 1987).

Liriomyza sativae é nativa da América, hoje está distribuída no Norte, Sul e Centro América, no pacífico está presente no Tahití e Hawaii (Spencer 1973). As fêmeas desta espécie

produzem perfurações sobre as folhas mais novas de seus hospedeiros para alimentar-se e colocar ovos internamente (endofíticos), os quais as informações obtidas mostram que o ciclo biológico é de $15,9 \pm 0,04$ dias (ovo-adulto), sendo: ovo ($2,7 \pm 0,01$ dias), larva ($4,1 \pm 0,03$ dias) e pupa ($9,1 \pm 0,03$ dias). A razão sexual é de 0,51 e as fêmeas vivem mais tempo ($19,3 \pm 1,09$ dias) que os machos ($16,2 \pm 0,96$ dias) (Issa & Marcano 1990; Araujo *et al* 2013). O conhecimento das características biológicas podem auxiliar na adoção de medidas de manejo integrado de *L. sativae* em cultivos de meloeiro e melhorar os sistemas de criação da mosca minadora em laboratório (Araujo *et al.* 2013).

Plantas hospedeiras

São insetos altamente polífagos, atacam a numerosos cultivos hortícolas, ornamentais e ervas daninhas. *Liriomyza huidobrensis* é relatado em mais de 15 famílias de plantas tais como Asteraceae, Apiaceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Chenopodaceae, Solanaceae, Cucurbitaceae, Leguminosaceae, Liliaceae (Stek 1996).

Liriomyza trifolii são encontrados nas seguintes espécies de vegetais *Allium porum* L., *A. schoeroprasum* L., *Daucus carota* L., *Apium graveolens* L., (Apiaceae); *Baccharis halimifolia* L., *Bidens alba* (L) DC., *B. pilosa* L., *Chrysanthemum* sp., *Dahlia* sp., *Erechtites hieracifolia* L., *Eupatorium* sp., *Flaveria trinervia* (Spreng) C. Mohr, *Gaillardia aristata* Pursh, *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker F, *Helianthus* sp., *Lactuca* sp., *Tagetes* sp., *Tridax procumbens* L., *Zinnia* sp. (Asteraceae); *Cleome viscosa* L. (Capparaceae); *Citrullus inatus* Schard., *Cucumis* sp., *Cucurbita* sp. (Cucurbitaceae); *Ricinus communis* L. (Euphorbiaeae); *Phaseolos* sp., *Pisum* sp., *Trifolium repens* L., *Vigna* (Fabaceae); *Hibiscus* (Malvaceae); *Avena sativa* L. (Poaceae); *Capsicum* sp., *Solanum americanum* Mill, *S. nigrum* L., *S. lycopersicon* Mill. (Solanaceae), *Kallstroemia máxima* (L.) Torr & Gray. *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae) (Spencer 1973).

Liriomyza sativae são encontradas em todas as famílias e espécies citadas anteriormente (Spencer 1973).

Dificuldades de identificação morfológica

A correta identificação de um inseto de interesse econômico é premissa básica para a solução de qualquer problema entomológico. Ela facilita a busca e a obtenção de toda a informação bibliográfica previamente existente sobre o tema (Fujihara 2011). Na ordem Diptera tem sido relatada a ocorrência de várias famílias que possuem espécies crípticas (Rothfels *et al.* 1979).

Define-se complexo de espécies crípticas como um conjunto de duas ou mais espécies indistinguíveis através da taxonomia tradicional e que são ou foram classificadas como um único táxon, “idênticos” até mesmo por taxonomistas especializados (Bickford *et al.* 2007, Araki *et al.* 2009).

Para o esclarecimento de possíveis dúvidas, aspectos ecológicos, biológicos e, mais recentemente, a caracterização molecular, vêm sendo usadas em complemento aos aspectos morfológicos para diferentes grupos de organismos. Alguns trabalhos na área de caracterização molecular foram realizados com o gênero *Liriomyza* (Navajas *et al.* 1992, 1994, 1997, Scheffer & Lewis 2005).

Em virtude da grande quantidade de hospedeiros comuns e à similaridade morfológica entre as espécies, a taxonomia dos agromyzídeos polífagos, principalmente àqueles do gênero *Liriomyza*, mostra-se bastante confusa (Parrella 1982). Foram realizados estudos com marcadores mitocondriais de *L. sativae* de várias partes do mundo (América do Norte, América do Sul, América Central, Ásia e Oriente Médio), onde os resultados mostraram que esta espécie abriga clados distintos, indicando a presença de espécies crípticas (Scheffer & Lewis 2005).

Complexos de espécies crípticas

O correto reconhecimento de status taxonômico das espécies que compõe um complexo tem implicações práticas para a conservação e o manejo na identificação de importantes espécies do ponto de vista econômico e medicinal (Bickford *et al.* 2007).

Outros autores consideram que tais espécies devam apresentar ainda divergência evolutiva recente, sejam separáveis apenas a nível molecular, ocorram em simpatria e apresentem isolamento reprodutivo entre elas (Bickford *et al.* 2007). A ocorrência de complexos é comum entre os artrópodes, inclusive nos de importância agrícola (Casimiro *et al.* 2006).

Devido às dificuldades de identificação morfológica, técnicas alternativas, como àquelas que envolvem análise de DNA, têm se mostrado úteis para estudos taxonômicos, pois disponibilizam informações não somente para a separação das espécies como também para estudos de filogenia (Collins & Paskewitz 1996, Beebe & Cooper 2000; Norris 2002). Bickford *et al.* (2007) ressaltam a importância de informações adicionais sobre os taxons analisados, tais como aspectos ecológicos, comportamentais e anatômicos.

Os trabalhos realizados na área de taxonomia molecular são reconhecidos por fornecerem indícios importantes para a delimitação de espécies (Vogler & Monghan 2007, Meier 2008), uma vez que podem ser produzidos em um ritmo rápido e sem a necessidade de pesquisadores especializados em taxonomia (Scotland *et al.* 2003, Vogler & Monghan 2007).

Krzywinski & Besansky (2006) consideram que o método ideal para a identificação de espécies crípticas deve apresentar as seguintes características: rapidez, baixo custo e facilidade de implantação, devendo ser aplicável aos vários estádios de desenvolvimento dos insetos minadores e útil para ambos os sexos. Além disso, deve permitir a obtenção dos mesmos resultados em qualquer local onde forem empregados. No entanto, a utilização generalizada de dados obtidos a

partir deste método tem gerado um grande problema: o desenfreado número de proposições de novas espécies crípticas, mesmo a partir de dados ainda incipientes (Tan *et al.* 2009).

Morfometria geométrica

A morfometria geométrica tem como objetivo descrever e representar a geometria das formas estudadas, descrevendo e localizando claramente as regiões onde ocorrem as mudanças e, reconstruindo graficamente tais mudanças na forma (Fornel 2005). Essas descrições baseiam-se em pontos de referência, denominados marcos anatômicos ou landmarks. Esses marcos caracterizam-se como pontos de correspondência presentes em cada objeto, que coincidem entre e dentro das populações estudadas (Dryden & Mardia 1998). Assim, são pontos morfológicos supostamente homólogos e que se repetem nos objetos de estudo.

Neste caso, a homologia é considerada um mapeamento de pontos, onde o importante é a correspondência relacionando pontos a pontos, e não partes a partes, sendo que um ponto é uma estrutura mais facilmente definida que uma parte estrutural (Bookstein 1991). As coordenadas desses pontos de referência em estruturas homólogas, sejam de duas ou três dimensões, são as variáveis que capturam as informações sobre a geometria das estruturas estudadas. A vantagem da utilização de coordenadas é a inclusão das informações acerca de suas posições relativas, e assim possibilitam a reconstrução da forma após a realização das análises uni ou multivariadas (Fornel 2005).

A morfometria geométrica representa uma área de conhecimento extremamente nova, cuja utilização e importância começaram a ser percebidas apenas nos últimos anos. Hoje já representa uma ferramenta importante em análises taxonômicas e sistemáticas, apresentando inúmeras vantagens em comparação à morfometria tradicional (Silveira 2011).

Os avanços recentes permitem melhor aproximação para medidas de variação de forma entre organismos e a relação dessas variações com o ambiente como um todo, promovendo inúmeras relações com diversos ramos da ciência. No campo da taxonomia, a morfometria geométrica é utilizada para determinar as medidas das diferenças entre as espécies de modo a elaborar diferentes referenciais para comparações (Peres-Neto 1995).

As principais vantagens da utilização da técnica da morfometria geométrica com o intuito de realizar a diferenciação de espécies, é a velocidade da coleta de material de teste (várias imagens de asas podem ser digitalizadas e analisadas em um mesmo dia), o baixo custo do processo (pois somente necessita de material para digitalização de imagens) e o material que pode ser facilmente obtido tanto de exemplares secos quanto frescos (Lyra *et al.* 2010).

A única desvantagem da utilização da técnica segundo Lyra *et al.* (2010), é que as asas apenas não devem estar danificadas, o que, comparado a tantas outras técnicas disponíveis não representa uma desvantagem tão clara. Análises moleculares, técnicas mais utilizadas atualmente juntamente à taxonomia para discriminação de espécies, necessita da utilização de equipamentos e reativos custosos para a realização da análise, além de haver a necessidade de tempo e experiência para a interpretação dos resultados (Calle *et al.* 2008).

As asas dos insetos são estruturas muito adequadas para a realização de estudos morfométricos. A primazia para a utilização dessas estruturas refere-se às suas características, tal como sua forma predominantemente bidimensional e o grande número de marcos anatômicos do tipo 1, possíveis de serem inseridos nas nervuras alares (Bookstein 1991, Monteiro & Reis 1999, Moratore 2009).

A efetividade da utilização da morfometria geométrica como ferramenta para a discriminação de espécies de Diptera pode ser vista na literatura, onde há diversos exemplos da utilização da técnica aplicada à venação alar como ferramenta para a resolução de problemas

taxonômicos, sistemáticos e descrições de variações morfológicas (Baylac & Daufresne 1996, De la Riva *et al.* 2001, Dujardin *et al.* 2003, Jirakanjanakit & Dujardin 2005, Camara *et al.* 2006, Dvorak *et al.* 2006, Calle *et al.* 2008; Ludosky *et al.* 2008, Aytakin *et al.* 2009, Francuski *et al.* 2009, Ljubinka *et al.* 2009, Kitthawee & Dujardin 2009, Lyra *et al.* 2010, Muñoz-Muñoz *et al.* 2011).

Esses trabalhos oferecem informações para a implementação da técnica, como por exemplo, a forma de obtenção dos dados e quais marcos e análises são possíveis de serem utilizados. O emprego desse tipo de técnica pode servir como instrumento para a diferenciação de espécies do gênero *Liriomyza*, distinção caracterizada de certo modo como controversa, devido às dificuldades taxonômicas encontradas para o grupo,

Por essas razões, a morfometria geométrica se apresenta como um tipo de técnica que permite, com menor custo e tempo, diferenciar espécies com um alto grau de confiança (Calle *et al.* 2008) atuando como uma auxiliar de análise muito eficiente.

DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial (mtDNA) dos metazoários é uma molécula circular, com conteúdo gênico extremamente conservado; cerca de 90% do genoma consiste de regiões codificantes. Apresenta dois genes para subunidades ribossômica (12S e 16S), 22 para os RNA transportadores (tRNA), três para as subunidades da enzima citocromo oxidase (COI, II e III), um para o citocromo B, dois para as subunidades de ATPase (6 e 8) e sete para as subunidades da NADH desidrogenase. Encerra ainda uma região não-codificadora conhecida como região controladora (RC), responsável pela origem da replicação e regulação da transcrição da molécula, e rica em A + T (Moritz *et al.* 1987).

A caracterização de genomas mitocondriais completos é bem estabelecida entre os vertebrados, mas não tão bem estabelecida entre os invertebrados. Uma das razões para isso é que muitas das espécies de invertebrados são relativamente pequenas, dificultando a obtenção de quantidade suficiente de mtDNA purificado para o sequenciamento (Hwang *et al.* 2001, Filgueira 2015).

O genoma mitocondrial completo de um indivíduo é possível de se obter, em poucos fragmentos, a partir de pequenas quantidades de DNA permitindo assim a obtenção de informações sobre o genoma mitocondrial de muitos invertebrados, podendo ser utilizados em diversos estudos de evolução molecular, genética de populações, filogenia molecular, RFLP e análise de rearranjos gênicos (Nelson *et al.* 1996, Hwang *et al.* 2001).

O genoma mitocondrial é peculiar, visto que apresenta herança materna, não apresenta recombinação; regiões intergênicas pequenas ou mesmo ausentes; não apresenta íntrons, DNA repetitivo, pseudogenes e elementos transponíveis; apresenta altas taxas de substituição, de inserções e deleções, que fazem com que sequências mitocondriais modifiquem-se de forma mais rápida do que sequências nucleares, exibindo assim altas taxas de evolução (Moritz *et al.* 1987, Sbisa *et al.* 1997, Ballard & Whitlo 2004, Hurst & Jiggins 2005).

Desta forma, os genes mitocondriais são menos suscetíveis à homogeneização gênica interespecífica (Wilson *et al.* 1985). O mtDNA tem sido amplamente usado para estudos taxonômicos, marcadores de evolução rápida e evolutivos, tanto em mamíferos como em artrópodes, por causa do fácil isolamento e da presença de sequências conservadas que tornam possíveis o uso de primers universais (Otranto & Stevens 2002). O gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) foi escolhido por possuir sequências nucleotídicas bastante conservadas, possibilitando o estudo comparativo entre espécies distintas (Palumbi 1996, Herbert *et al.* 2003, 2004, Barrett & Herbert 2005).

Marcadores moleculares

Marcador molecular seria uma determinada região dentro de um gene qualquer que diferencia dois ou mais indivíduos. Os marcadores moleculares são herdados geneticamente e podem ser aplicados para diversos fins, tais como filogenia, ecologia, genética de populações, mapeamentos e análises de similaridade, distancia genética e taxonomia molecular (Lopes *et al.* 2002).

Marcadores moleculares de DNA têm sido usados para sinalização de genes de resistência à doenças, insetos e pragas; avaliação e caracterização de germoplasma; melhoramento dos pais de híbridos; estudo de introgressão gênica e seleção auxiliada por marcadores; desenvolvimento de mapas genéticos; determinação de grupos heteróticos e associação com regiões genômicas que afetam a heterose; reconstituição de *pedigrees*; testes de pureza genética; seleção de resistência a patógenos exóticos ainda inexistentes em determinada região; associação com caracteres quantitativos; estudos de interação genótipo-ambiente; processos legais; entre outros (Rafalski & Tingey 1993, Ferreira & Grattapaglia 1998, Milach 1998a, 1998b). Pode-se utilizar qualquer tipo de DNA, sendo este obtido de pequenas quantidades de tecido (Castigione & Bicudo 2003).

Logo, a utilização de dados moleculares, em diversos estudos, vem sendo feita cada vez com maior frequência nos mais diferentes grupos taxonômicos, contribuindo para avanços consideráveis na biologia das espécies, ecologia, comportamento, genética e evolução (Sunnucks 2000). Devido à dificuldade de identificação morfológica de alguns grupos taxonômicos, técnicas alternativas, como as que envolvem análises de DNA, têm se mostrado úteis para estudos de identificação de espécies crípticas, pois disponibilizam informações não somente para a separação das espécies como também na ordem.

Na ordem Diptera tem sido relatada à ocorrência de espécies crípticas, ou seja, que se assemelham em sua morfologia e são distintas em aspectos biológicos, podendo assim fazer parte de um complexo de espécies (Rothfels *et al.* 1979). Auxilia na resolução de incertezas taxonômicas das famílias de Caliphoridae, Sarcophagidae, Muscidae, entre outras (Carvalho & Mello-Patiu 2008, Zayed 2009). Várias metodologias foram desenvolvidas para revelar marcas genéticas, e numerosas abordagens baseadas em PCR (“Polymerase chain reaction”) tem sido desenvolvidas para revelar AFLP’s, RAPD’s, SSCP’s, SINES, SNP’s, STRs, e outras características polimórficas do genoma (Avisé 2004, Carvalho & Mello-Patiu 2008).

Na sistemática molecular da maioria dos animais, o mtDNA desempenha um papel importante no estudo genômico dos insetos (Avisé 2000). O grande número de cópias, haploidia e a disponibilidade de primers conservados e bem estabelecidos por Simon *et al.* (1994) facilitam a obtenção de dados de sequências de muitas espécies de insetos não estudados anteriormente (Wells & Stevens 2008).

DNA *barcode*

O DNA *barcode* tem sido proposto como uma ferramenta universal para identificação da diversidade biológica de Eumetazoários ajudando a aumentar a sensibilidade nas análises. O DNA mitocondrial (mtDNA) se tornou um bom marcador molecular, pois apresentam taxa de substituição / evolução diferentes. Portanto, a escolha desses marcadores poderá auxiliar nos estudos que abordam problemas desde a identificação de indivíduos, identificação de espécies crípticas, e até mesmo a formulação de hipóteses filogenéticas ou de grupos muito específicos (Solé-cava 2001). Diferentes estudos mostraram que o DNA *barcode* é um sistema de identificação universal eficaz para ampla variedade de organismos metazoários (Hebert *et al.* 2003, 2004, Barrett & Herbert 2005).

No entanto, esta região já apresentou limitações na taxonomia de espécies de Dípteros tais como *Lucilia cuprina*, *Chrysomya megacephala*, *Ch. saffrana*, *Ch. albifrontalis* e *Calliphora stygia* não puderam ser resolvidos com base nesses dados (Harvey *et al.* 2008).

Muitos grupos de insetos de importância agrícola fazem parte de complexos de espécies, fazendo com que a identificação através da taxonomia clássica seja difícil até mesmo para especialistas (Busvine 1980, Della Torre *et al.* 2002, Clark *et al.* 2005). Portanto, através do DNA barcode diferentes espécies de insetos praga, inimigos naturais, espécies endêmicas, não endêmicas e em qualquer estágio de desenvolvimento estão sendo identificadas de forma rápida e segura (Garipey *et al.* 2007, Jenkins *et al.* 2012). Dessa forma, estudos com taxonomia molecular utilizando genes mitocondriais se tornam importantes por auxiliar na identificação dos espécimes em menor intervalo de tempo e com maior exatidão, além de explorar a entomofauna trabalhada.

Genética de Populações

A habilidade de adaptação de um organismo depende da sua variabilidade genética. A informação da variação genética dentro e entre as populações é importante para compreender a história evolutiva de diferentes populações de insetos (Yan *et al.* 1998). O estudo de estruturação genética se faz essencial para o entendimento da dinâmica das populações e para a análise de fatores responsáveis pela resistência e adaptação ecológica. Assim, estudos genéticos podem ajudar a compreender melhor o nível de diferenciação das populações.

Escassas são as informações existentes acerca da variabilidade intraespecífica, interespecífica, estruturação e filogenética das populações de *Liriomyza*. No entanto, com o desenvolvimento de marcadores moleculares para espécies dessa família, os estudos genéticos nestes dípteros foram impulsionados (Nakamura *et al.* 2013). Atualmente, existem já

microsatélites isolados para várias espécies de agromyzídeos (Tang *et al.* 2015), tais como *L. sativae*.

De um modo geral, o estudo genético permite estimar níveis de diferenciação genética, tamanho das populações e estrutura evolutiva; entender os mecanismos evolutivos que regulam a variação genética e os processos que permitem a divergência entre as espécies; bem como, determinar a origem de processos adaptativos (Hartl 2000).

É também possível perceber a evolução das espécies, uma vez que os padrões de acasalamento, o tamanho da população e o fluxo migratório influenciam a estrutura genética (De Meeûs *et al.* 2007, Solano *et al.* 2009).

Literatura Citada

- Abe, Y. & K. Konishi, 2004.** Taxonomic notes on *Gronotoma* (Hymenoptera: Eucolidae) parasitic on the serpentine leafminer, *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). *ESAKIA* 44: 103-110.
- Araki, A.S., F.M. Vigoder, L.G.S.R. Bauzer, G.E.M. Ferreira, N.A. Souza, I.B. Araújo, J.G.C. Hamilton, R.P. Brazil & A.A. Peixoto. 2009.** Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Plos Negl. Trop. Dis.* 3:365.
- Araujo, E.L., D.R.R. Fernandes, L.D. Geremias, A.C. Menezes Netto & M.A. Filgueira. 2007.** Mosca minadora associada à cultura do meloeiro no semi-árido do Rio Grande do Norte. *Caatinga* 20: 210-212.
- Araujo, E.L., Nogueira, C.H.F., Menezes Netto, A.C. & E.E.S. Bezerra. 2013.** Biological aspects of the leafminer *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) on melon (*Cucumis melo* L.). *Ciênc. Rural* 43: 579-582.
- Asadi, R., A.A.T. Fathipour, S. Moharramipour & E. Rakhshani. 2006.** Identificación of parasitoids and seasonal parasitoids of the Agromyzid leafminers genus *Liriomyza* (Dip: Agromyzidae) in Varamin, Iran. *J. Agric. Sci. Technol.* 8:293-303.
- Avise J. 2000.** *Phylogeography: The history and formation of species.* Cambridge, Harvard Univ. Press 447p.

- Aytekin, S., A.M. Aytekin & B. Alten. 2009.** Effect of different larval rearing temperatures on the productivity (Ro) and morphology of the malaria vector *Anopheles superpictus* Grassi (Diptera: Culicidae) using geometric morphometrics. *J Vector Ecol.* 34:32-2.
- Ballard, J.W.O. & Whitlock, M.C. 2004.** The incomplete natural history of mitochondria. *Mol. Evol.* 13: 729-744.
- Barrett, R.D.H. & P.D.N. Hebert. 2005.** Identifying spiders through DNA barcodes. *J. Zool.* 83: 48-491.
- Baylac, M. & T. Daufresne. 1996.** Wing venation variability in *Monarthropalpus buxi* (Diptera, Cecidomyiidae) and the quaternary coevolution of box (*Buxus sempervirens* L.) and its midge: a geometrical morphometric analysis. p. 285-301. In: Marcus, L.F.; Corte, M.; Loy, A.; Naylor, G.J.P. & D. E. Slice. **Advances in Morphometrics.** NATO-ASI Series A, Plenum Press, New York. 630 p.
- Beebe, N.W. & R.D. Cooper. 2000.** Systematics of malaria vectors with particular reference to the *Anopheles punctulatus* group. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 30: 1-17.
- Bhuiya, B.A., Mazumdar, S., Pasha, M.K., Islam, W., Miah, M.I & Hossain, M.S. 2010.** A preliminary report on the agromyzid leaf miner pest attack on some agricultural crops and weeds in Bangladesh. *J. Taxon. Biodiv. Res.* 4: 47-50.
- Bickford, D., David J.L., Navjot S.S., Peter, K.L.N., Rudolf, M., Winker, K., Krista, K. Ingram and D. Indraneil. 2007.** Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 22: 3
- Bookstein, F. L. 1991.** Morphometric tolos for landmark data: geometry and biology. Cambridge, Cambridge University Press 455p.
- Busvine, J.R. 1980.** Cryptic species of insect disease vectors and their importance. *Endeavour* 4: 108-112
- Calle, D.A., Quiñones, M.L., Erazo, H.J. & N. Jaramillo. 2008.** Discriminación por morfometria geométrica de once especies de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) presentes en Colombia. *Biométrica* 28: 371-385
- Camara, M., Caro-Riaño, H., Ravel, S., Dujardin, J.P., Hervouet, J.P., DE Meeus, T., Kagbadouno, M.K., Bouyer, J. & P. Solano. 2006.** Genetic and morforphometric evidence population isolation of *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera: Glossinidae) on the Loos Island, Guinea. *J. Med. Entomol.* 43: 853-860.
- Capinera, J.L. 2001.** Vegetable Leafminer, *Liriomyza sativae* Blanchard (Insecta: Diptera: Agromyzidae). University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, EDIS. Disponivel em <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN50700.pdf>. Acesso em: 18 Jan. 2016.

- Carvalho, C.J.B. & C.A Mello-Patiu. 2008.** Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Rev. Bras. Entomol.* 52: 390-406.
- Casimiro, S., Coleman, M., Mohloai, P., Hemingway, J. & B. Sharp. 2006.** Insecticide resistance in *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) from Mozambique. *J. Med. Entomol.* 43: 267-275.
- Castiglioni, L. & H.E.M.C. Bicudo. 2003.** A Técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e suas aplicações para estudos em genética molecular. *Rev. UNORP.* 3: 63-77.
- Chandler, L.D. 1984.** Parasites of *Liriomyza sativae* Blanchard on bell peppers in South Texas. *J. Georgia Entomol. Soc.* 19: 199-203.
- Clark, A.R., K.F. Armstrong, A.E. Carmichael, J.R.S. Raghu, G.K. Roderick & D.K. Yeates. 2005.** Invasive phytophagous pests arising through a recent tropical evolutionary radiation: the *Bactrocera dorsalis* complex of fruit Flies. *Annu. Rev. Entomol.* 50: 293-319.
- Collins, D.W. 1996.** The separation of *Liriomyza huidobrensis* from related indigenous and non-indigenous species encountered in the United Kingdom using cellulose acetate electrophoresis. *Ann. App. Biol.* 128: 387-398.
- Debeko, A., T. Kashiwagi., S. Tebayashi & C. Kim. 2007.** Nitrogenous ovipositional deterrents in the leaves of sweet pepper (*Capsicum annuum*) at the mature stage against the leafminer *Liriomyza trifolii* (Burgess). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 421-426.
- Della Torre, A., C. Costantini, N.J. Besansky, A. Caccone, V. Petrarca, J.R. Powell & M. Coluzzi. 2002.** Molecular and ecological aspects of incipient speciation within *Anopheles gambiae*: the glass is half full. *Environ. Sci.* 289: 115-117.
- De Meeûs, T., McCoy, K.D., Prugnolle, F., Chevillon, C., Durand, P., Hurtrez-Boussès, S. & F. Renaud. 2007.** Population genetics and molecular epidemiology or how to “débusquer la bête”. *Infect. Genet. Evol.* 7: 308-32.
- De la Riva, J., Le Pont, F., Matias, A. Mollinedo, S. & J.P. Dujardin. 2001.** Wing geometry as a tool for studying the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) complex. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96: 1089-1094.
- Dryden, I.L. & K.V. Mardia. 1998.** Statistical shape analysis. New York, John Wiley & Sons 347p.
- Dujardin, J.P., Le Pont, F. & M. Baylac. 2003.** Geographical versus interspecific differentiation of sand flies (Diptera: Psychodidae): a landmark data analysis. *Bull. Entomol. Res.* 93: 87-90.
- Dvorak, V., Aytekin, A.M., Alten, B., Skarupova, S., Votypka, J. & P. Volf. 2006.** A comparison of the intraspecific variability of *Phlebotomes sergenti* Parrot, 1917 (Diptera: Psychodidae). *J. Vector Ecol.* 31: 229-238.

- Étienne, J. & M. Martínez. 1996.** Les Agromyzidae de L y Le de San Martin, Antilles (Diptera). R. Fr. Entomol. 18: 121-128.
- Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. 1998.** Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3 ed. Brasília, EMPRAPA – CENAGEM, 220p.
- Fernandes, O.A. 2004.** Melão: campo minado. Pelotas, Cultivar, 2 p. (Comunicado Técnico 23).
- Figueiredo Junior, C.A.S. 2015.** Diversidade genética de dípteros Calliphoridae de importância forense. Tese de Doutorado. UFPE. RECIFE, 100p.
- Fornel, R. 2005.** Estudo de variação morfológica craniana entre quatro blocos populacionais de *Ctenomys lami* (Rodentia, Ctenomyidae) através de morfometria geométrica. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 78 p.
- Francuski, L., Vujic, A., Ludoski, J. & V. Milankov. 2009.** Identification of the species *Cheilosia variabiles* group (Diptera: Syrphidae) from the Balkan Peninsula using wing geometric morphometrics, with the revision of status of *C. melanopa* Vujic, 1996. Contrib. Zool. 78: 129-140.
- Fujihara, R.T., L.C. Forti, M.C. Almeida & E.L.L. Baldin. 2011.** Insetos de importância econômica: guia ilustrado para identificação de famílias. Botucatu, FEPAF Editora, 391p.
- Garipey, T.D., U. Kuhlmann, C. Gillott & M. Erlandson. 2007.** Parasitoids, predators and PCR: the use of diagnostic molecular markers in biological control of Arthropods. J. Appl. Entomol. 131: 225-240.
- Gencer, L. 2004.** A study on the chalcidoid (Hymenoptera: Chalcidoidea) parasitoids of leafminer (Diptera: Agromyzidae) in Ankara Province. 28: 119-122
- Gencer, L. 2009.** Contribution to the knowledge of the chalcid parasitoid complex Hymenoptera: Chalcidoidea) of agromyzid leafminers (Diptera: Agromyzidae) from Tukey, with new and records. J. Plant Pro Res. 49: 158-161.
- Harvey, M.L., Gaudieri, S., Villet, M.H. & I.R. Dadour. 2008.** A global study of forensically significant calliphorids: implication for identification. Forensic Sci. Int. 177: 66-67.
- Hartl, D.L. 2000.** A primer of population genetics. 3rd Edition. Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc. 54-58.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball & J.R. Dewaard. 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 270: 313-321.
- Hebert, P.D.N., M.Y. Stoeckle, T.S. Zemlak & C.M. Francis. 2004.** Identification of birds through DNA barcodes. Plos Biol. 2: 1657-1663.

- Hernández, G.M.A.M., A. Cruz & A. Carnero. 1999.** Eficiencia de la utilización de microtúnel de malla frente a la aplicación de los insecticidas Abamectina y ctiomacina en el control del minador *Liriomyza trifolii* (Burgess, 1880) (Diptera: Agromyzidae) en el cultivo de la lechuga. Bol. Sanid. Veg. Plagas.
- Hurst, G.D.D. & F.M. Jiggins. 2005.** Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci. 272:1525-1534
- Hwang, K.K., Eissenberg, J.C. & H.J. Worman. 2001.** Transcriptional repression of euchromatic genes by *Drosophila heterochromatin* protein 1 and histone modifiers. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98: 11423-11427.
- Issa, S. & R. Marcano. 1991.** Ciclo de vida de *Liriomyza sativae* (Blanchard) (Diptera: Agromyzidae) en tomate (*Lycopersicon esculentum*). Bol. Entomol. Venez. 6: 37-45.
- Jenkins, T.A., J.L. Chapman & O.L. Micallef. 2012.** Molecular techniques for the detection and differentiation of host and parasitoid species and the implications for fruit fly management. J. Insects 3: 763-788.
- Jirakanjanakit, N. & J.P. Dujardin. 2005.** Discrimination of the *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) laboratory lines based on wing geometry. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 36: 858-861.
- Jirakanjanakit, N.S., Leemingsawat, S., Thongrungrat, C., Apiwathnasorn, S., Singhanityom, C.B. & J.P. Dujardin. 2007.** Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti*. Trop. Med. Int. Health. 12: 1354-1360.
- Kitthawee, S. & J.P. Dujardin. 2009.** The geometric approach to explore the *Bactrocera tau* complex (Diptera: Tephritidae) in Thailand. Zoology. 113: 243-249.
- Krzywinski, J., Grushko, O. G. & N. J. Besansky. 2006.** Analysis of the complete mitochondrial DNA from *Anopheles funestus*: an improved dipteran mitochondrial genome annotation and a temporal dimension of mosquito evolution. Mol. Phylogenet. Evol. 39: 417-423
- Lambkin, C.L., S.A. Fayed, C. Manchester., J. LaSalle., S.J. Scheffer and D.K. Yeates. 2008.** Plant host and parasitoid associations of leaf mining flies (Diptera: Agromyzidae) in the Canberra region of Australia. Aust. J. Entomol. 47: 13-19.
- Larraín, S.P. 2004.** Situación de la mosca minadora *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) en cultivos de papa del cono sur de América y sus perspectivas de manejo integrado. ALAP. 5-10pp.

- Le Lagadec, M.D., Chown, S.L. & C.H. Scholtz. 1998.** Desiccation resistance and water balance in southern African keratin beetles (Coleoptera: Trogidae): the influence of body size and habitat. *J. Comp. Physiol. B-Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 168: 112-122.
- Lima, M.A.A. 2012.** Resistência de genótipos de meloeiro à mosca-minadora *Liriomyza sativae* (Blanchard, 1938) (Diptera: Agromyzidae). Tese de Doutorado, ESALQ-USP, São Paulo, 121p.
- Liu, T.X., L. Kang., M. Heinz & J. Trumble. 2009.** Biological control *Liriomyza* leafminers progress and perspective. *Perspectives in Agriculture Veterinary Science, Nut. Nat. Res.* 4: 1-16.
- Lizarrága, A. 1990.** Biología de la mosca minadora *Liriomyza huidobrensis* Blanchard em la papa (Diptera: Agromyzidae). *ALAP.* 3: 30-39.
- Ljubinka, F. Ludoski, J., Ante, V. & M. Vesna. 2009.** Wing geometric morphometric inferences on species delimitation and intraspecific divergent units in the *Merodon ruficornis* group (Diptera, Syrphidae) from the Balkan Peninsula. *Zool. Sci.* 26: 301-308.
- Lopes, W. P., Paula, A., Sevilha, A. C. & Silva, A. F. 2002.** Composição da flora arbórea de um trecho de Floresta Estacional no Jardim Botânico da Universidade Federal de Viçosa (Face Sudoeste), Viçosa, Minas Gerais. *Rev. Árvore.* 26: 339-347,
- Ludoski, J., Francuski, L., Vujic, A. & V. Milankov. 2008.** The *Cheilosia canicularis* group (Diptera: Syrphidae): species delimitation and evolutionary relationships based on wing geometric morphometrics. *Zootaxa* 1825: 40-50.
- Lyra, M.L., Hatadani, L.M., De Azeredo-Espin, A.M.L & L.B. Klaczko. 2010.** Wing morphometry as a tool for correct identification of primary and secondary New World screwworm fly. *Bull. Entomol. Res.* 100: 19-26.
- Malipatil, M.B., P.M. Ridland., A. Rauf., J. Watung & D. Kandowangko. 2004.** New records of *Liriomyza* Milk (Agromyzidae: Diptera) leafminer from Indonèsia. *Formosan Entomol.* 24: 287 – 292.
- Martin, A. D., R. S. Vernon & R. H. Halltt. 2005.** Influence of color and trapheight on captures of adult pea leafminer, *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) (Diptera: Agromyzidae), in celery. *J. Entomol. Soc. Ont.* 136: 25-35.
- Martínéz, M. & J. Étienne. 2002.** Liste Systématique et biogéographique des Agromyzidae (Diptera) dela región neotropical. *Boll. Zool. Agr. Bachic. Ser. II.* 34: 25-52
- Marote, C. 2009.** Padroes genético-morfológicos em populações de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Dissertação de Mestrado. USP, São Paulo. 84p.
- Meyer, C.P. & G. Paulay. 2005.** DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLOS Biology.* 3:422.

- Milach, S.C.K. 1998a.** Marcadores de DNA em plantas. UFRGS, Porto Alegre, 141 p.
- Milach, S.C.K. 1998b.** Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares. In: Borém, Giudice, Sakiyama, Sediya, Moreira, Portugal (eds.) Biossegurança, Proteção de Cultivares, Acesso aos Recursos Genéticos e Propriedade Industrial na Agropecuária. Viçosa, 182p.
- Monteiro, L.R. & S.F. dos Reis. 1999.** Princípios de morfometria geométrica. Holos Editora, Ribeirão Preto. 189 p.
- Moritz, C., T.E. Dowling & W.M. Brown. 1987.** Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18:269-292 .
- Muñoz-Muñoz, F. Talavera, S. & N. Pagès. 2011.** Geometric morphometrics of the wing in the subgenus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae): from practical implications to evolutionary interpretations. *J. Med. Entomol.* 48: 129-139.
- Murphy, S.T. & J. Lasalle. 1999.** Review article: balancing biological control strategies in the IPM of new world invasive *Liriomyza* leafminers in field vegetable crops. *Bioc. News Inf.* 20: 91-104.
- Musgrave, C.A., Poe S.L. & D.R. Bennett. 1975.** Leafminer population estimation in polycultured vegetables. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.*, 88: 156-159.
- Nakano, O., F.M. Wiendl & K. Minami. 1967.** Uma nova praga (Agromyzidae) da couve. *Rev. Agrícola.* 42: 1-10 p.
- Nakamura, M., Matsumoto, K., Iwamoto, Y., Muguruma, T., Nakazawa, N., Hatori, R., Taniguchi, K., Maeda, R. and K. Matsuno. 2013.** Reduced cell number in the hindgut epithelium disrupts hindgut left-right asymmetry in a mutant of pebble, encoding a RhoGEF, in *Drosophila embryos*. *Mech. Dev.* 130(2-3): 169--180.
- Navajas, M., D. Cotton, S. Kreiter & J. Gutierrez. 1992.** Molecular approach in spider mites (Acari: Tetranychidae): preliminary data on ribosomal DNA sequences. *Exp. Appl. Acarol.* 15: 211-218.
- Navajas, M., J. Gutierrez, O. Bonato, H.R. Bolland & S. Mapangou-Divassa. 1994.** Intraspecific diversity of the cassava green mite *Mononychellus progressivus* (Acari: Tetranychidae) using comparisons of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding. *Exp. Appl. Acarol.* 18: 351-360.
- Navajas, M., J. Gutierrez & T. Gotoh. 1997.** Convergence of molecular and morphological data reveals phylogenetic information on *Tetranychus* species and allows the restoration of the genus *Amphitetranychus* (Acari: Tetranychidae). *Bull. Entomol. Res.* 87: 283- 288.
- Nelson, W.S., Prodöhl, P.A. & J.C. Avise 1996.** Development and application of long PCR for the assay of full-length animal mitochondrial DNA. *Mol. Ecol.* 5: 807-810.

- Norris, D.E. 2002.** Genetic markers for study of the anopheline vectors of human malaria. *Int. J. Parasitol.* 32: 1607-1615.
- Noyes, J. 2004.** Universal chalcidoidea database. The Natural History Museum (em línea). Disponível em: <http://www.nhm.ac.uk/entomology/chalcidoids/>
- Otranto, D. & J.R. Stevens. 2002.** Molecular approach to the study of myiasis-causing larvae. *Int. J. Parasitol.* 32 : 1345-1360.
- Pacheco, M.F. 1985.** Plagas de los cultivos agrícolas en Sonora y Baja California. SARH-INFAP-CIANO-CAEVY. Libro Técnico. N°1 Cd. Obregón, Sonora, Méx. 414p.
- Palacios, T.R.E., J. Romero N., J. Étienne., J.L. Carrillo S., J.M. Valdez C., H. Bravo M., S.D. Koch., V. López M. & A.P. Terán V. 2008.** Identificación distribución y plantas hospedeiras de diez especies de agromyzidae (Insecta: Diptera), de interés agronómico en México. *Acta Zool. Mex.* 24: 7-32.
- Palumbi, S.R. 1996.** Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis, D.M., Moritz, C. & Mable, B.K. [eds.], *Molecular Systematics*. Sunderland, MA. Sinauer Associates, Inc. 205–247.
- Parrella, M.P. & K.L. Robb. 1982.** Technique for staining eggs of *Liriomyza trifolii* within chrysanthemum, celery, and tomato leaves. *J. Econ. Entomol.* 75: 383-384
- Parrella, M.P. & C.B. Keil. 1984.** Insect pest management: the lesson of *Liriomyza*, *Bull. Entomol. Soc. Am.* 30: 22- 25.
- Parrella, M.P. 1987.** Biology of *Liriomyza*. *Annu. Rev. Entomol.* 32: 201-224.
- Peres-Neto, P.R. 1995.** Introdução a análises morfométricas. P. 57-89. In: P. R. Peres -Neto; J. L. Valentin & F. A. S. Fernandez (Eds.). *Tópicos em tratamentos de dados biológicos*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 161p.
- Petcharat, J., Z. Ling., Z. Weiqui., X. Zaifu & W. Quisong. 2002.** Larval parasitoids of agromyzid leaf miner genus *Liriomyza* in the southern Thailand: species and their host plants. *J. Sci. Technol.* 24: 467-472.
- Rafalski, J.A. & S.V. Tingey. 1993.** Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet.* 9: 275-279
- Reitz, S.R. & J.T. Trumble 2002.** Interspecific and intraspecific differences in two *Liriomyza* leafminer species in California. *Entomol. Exper. Appl.* 102(2): 101-113.
- Renault, D., Hance, T., Vannier, G. & P. Vernon. 2003.** Is body size an influential parameter in determining the duration of survival at low temperatures in *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae) *J. Zool.* 259: 381-388.

- Rothfels, K.H. 1979.** Chromosomal variability and speciation in blackflies. Symposia of the Royal Entomological Society of London. Antarct. Sci. 10: 207-224.
- Sbisa, E., F. Tanzariello, A. Reyes, G. Pesole & C. Saccone. 1997.** Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene* 205:125-140
- Scheffer, S.J. & M.L. Lewis. 2005.** Mitochondrial phylogeography of vegetable pest *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae): divergent clades and invasive populations. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98: 181-186.
- Salvo A. & G.R. Valladares. 2007.** Parasitoides de minadores de hojas y manejo de plagas. *Cienc. Inve. Agrár.* 34: 167-185.
- Schuster, D.J. & R.A. Wharton. 1993.** Hymenopterous parasitoids of leaf-mining *Liriomyza* spp. (Diptera: Agromyzidae) on tomato in Flórida. *Environ. Entomol.* 22:1188-1191.
- Scotland, R.W., Olmstead, R.G. & J.R. Bennett. 2003.** *Systematic Biology*.52: 539-548
- Silveira, B.E. 2011.** Morfometria geométrica comparativa de asas de Sarcophagidae (Diptera) de interesse forense: uma ferramenta eficaz para a identificação? Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 59 p.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & P. Flook. (1994)** Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87:651–70.
- Singh, S. & Ipe, I.M. 1973.** The Agromyzidae from India. St. John's College. 286p.
- Spencer, K.A. 1973.** Agromyzidae (Diptera) of Economic Importance. Series Entomologica. Netherlands. 418p.
- Spencer, K.A. & J.C. Steyskal. 1986.** Manual of the Agromyzidae (Diptera) of the United States Departamento of Agriculture Washington D. C. Agric. Handb. 638p.
- Solé-Cava, A.M. 2001.** Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: Matioli, Sr(ed.). *Biol. Mol. Evol.* Ribeirao preto: Editora Holos. 172-192.
- Solano, P., La Rocque, S., Cuisance, D., Geoffroy, B., De Meeûs, T., Cuny, G. & Duvallet, G., 1999.** Intraspecific variability in natural populations of *Glossina palpalis gambiensis* from West Africa, revealed by genetic and morphometric analyses. *Med. Vet. Entomol.* 13:401-07.
- Stebbins, G.L. 1950** Variation and evolution in plants. Columbia University Press. *Sci.*112: 764-766

- Steck, G.J. 1996.** Pea leafminer, *Liriomyza huidobrensis*. (Diptera: Agromyzidae). Entomology Circular Num. 378, Florida Dept. Agric. Cons. Serv., 33p.
- Sunnucks, P. 2000.** Efficient genetic markers for population biology. TREE. 15:199-203
- Tan, D.J., Dvinge, H., Christoforou, A., Bertone, P., Martinez Arias, A. & K.S. Lilley 2009.** Mapping organelle proteins and protein complexes in *Drosophila melanogaster*. J. Proteome Res. 8: 2667-2678.
- Tang, X.T., Tao, H.H. & Du, Y.Z. 2015.** Microsatellite-based analysis of the genetic structure and diversity of *Aleurocanthus spiniferus* (Hemiptera: Aleyrodidae) from tea plants in China. Gene 560: 107-113.
- Tantowijoyo, W. & A.A. Hoffmann 2010.** Identifying factors determining the altitudinal distribution of the invasive pest leafminers *Liriomyza huidobrensis* and *Liriomyza sativae*. Entomol. Exp. Appl. 135: 141-153.
- Téllez, M.M., E. Sánchez, L. Lara & Urbaneja. 2005.** Influence de la densidad de *Liriomyza bryoniae* en la mortalidad provocada por los parasitoides *Chrysonotomya formosa* y *Diglyphus isaea*. Bol. San. Veg. Plagas 31: 385-395.
- Tran, T.T.A., Tran, D.H., Konishi, K. & M.Takagi. 2005.** The vegetable leafminer *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) and its parasitoids on cucumber in the Hochiminh Region of Vietnam. J. Fac. Agric. 50: 119-124.
- Trouvé, C.M., M. Phalip & C. Martin. 1991.** Un nouveau ravageur en Europe. La mouche mineuse sud-américaine. Phytoma 429: 42-46.
- Toševski, I., Milenković, S., Krstić, O., Kosovac, A., Jakovljević, M., Mitrović, M. & J. Jović. 2014.** *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae), a new invasive pest in Serbia. Zaštita bilja, 65: 99-104.
- Vogler, A.P. & M.T. Monaghan. 2007.** Recent advances in DNA taxonomy. J. Zool. Syst. Evol. Res. 45: 1-10.
- Xu, P., Z.W. Wan., X. Chen., S. Liu. & M.G. Freng. 2007.** Immature morphology and development of *Opius carricivora* (Hymenoptera: Braconidae), na endoparasitoid of the leafminer *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae). Ann. Entomol. Soc. Ann. 100: 425-432.
- Wang L-S, Leebens-Mack, J., Wall, P.K., Beckmann, K., Pamphilis, C.W. & T. Warnow. 2009.** The impact of multiple protein sequence alignment on phylogenetic estimation. IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinf.8:1108-1119.
- Wells, J.D., Wall, R. & J.R. Stevens. 2008.** Phylogenetic analysis of forensically important *Lucilia flies* based on cytochrome oxidase 1: a cautionary tale for forensic species determination. Int. J. Leg. Med. 121:229-319.

Wilson, A.C., R.L. Cann, M. George, U.B. Gyllensten, K.M. Helmbychowski, R. G. Higushi E.M. Palumbi, R.D. Sage & M. Stoneking. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linnean Soc.* 26: 375-400.

Winkler, I.S., C.C. Labandeira, T. Wappler & P. Wilf. 2010. Distinguishing Agromyzidae (Diptera) leaf mines in the fossil record: new taxa from the Paleogene of North America and Germany and their evolutionary implication. *J. Paleo.* 84: 935-954.

Zayed, A. 2009. Bee genetics and consevation. *Apidologie* 40: 237-262.

CAPÍTULO 2

TAXONOMIA INTEGRATIVA APLICADA A POPULAÇÕES MEXICANAS DE *Liriomyza* (DIPTERA: AGROMYZIDAE)¹

KARLA D.S. SOMBRA¹, MOISES T.S. FREITAS², HERBERT Á.A. SIQUEIRA¹ E VALDIR Q. BALBINO¹

¹ Departamento de Agronomia – Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil.

² Departamento de Genética - Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50732-970 Recife, PE,- Brasil.

¹Sombra, K.D.S., M.T.S. Freitas, H.A.A. Siqueira & V.Q. Balbino. Taxonomia integrativa aplicada a populações mexicanas de *Liriomyza* (Diptera: Agromyzidae). A ser submetido.

RESUMO - A dificuldade de identificação de agromyzídeos muitas vezes acarreta em identificações errôneas, sendo que tais erros de identificação têm importante impacto, principalmente quando relacionados às questões fitossanitárias e de importância econômica. Assim, os objetivos deste estudo foram confirmar o status taxonômico de populações mexicanas, identificando as espécies de *Liriomyza*. Além disso, conhecer a variabilidade entre elas e comparar geneticamente essas populações. Foram estudadas seis populações mexicanas (Veracruz, Oaxaca e Sinaloa). Para isso, a variabilidade morfológica entre as populações foi avaliada através de análises morfométricas de caracteres alares. Além disso, as populações foram comparadas entre si utilizando o COI mtDNA. Em conclusão, os resultados foram satisfatórios, acarretando em um ótimo funcionamento das técnicas na diferenciação das três espécies tais como *Liriomyza sativae*, *L. trifolii* e *L. commelinae*. Foi observada variabilidade morfométrica intraespecífica entre as populações. A análise molecular indicou variabilidade intraespecífica entre as populações.

PALAVRAS CHAVE: Taxonomia, morfometria, técnicas moleculares, dípteros

TAXONOMIA INTEGRATIVE APPLIED TO MEXICAN POPULATIONS OF *Liriomyza*

(DIPTERA: AGROMYZIDAE)

ABSTRACT - The agromyzideos identification difficulty often leads to misidentifications, and such misidentifications have major impact, especially when related to phytosanitary issues and economic importance. The objective of this study were to confirm the taxonomic status of mexican populations, identifying the species of *Liriomyza*. Also, knowing the variability between them and compare genetically these populations. Six mexican populations were studied (Veracruz, Oaxaca and Sinaloa). For this, the morphological differences between populations was evaluated by morphometric analysis alar characters. Furthermore, the populations were compared using the COI mtDNA. In conclusion, the results were satisfactory, resulting in optimum performance of techniques to differentiate the three species such as *Liriomyza sativae*, *L. trifolii* and *L. commelinae*. It was observed morphometric intraspecific variability between populations. The molecular analysis indicated intraspecific variability between populations.

Key words: Taxonomy, morphometry, technical molecular, Diptera

Introdução

O gênero *Liriomyza* Milk é formado por pequenas moscas cujas larvas são fitófagas (Spencer & Steyskal 1986), sendo o mais estudado e documentado da família Agromyzidae (Shiao 2004). Algumas espécies são cosmopolitas e apresentam importância quarentenária (Parrella 1987, Kamiji & Iwaizumi 2013). As espécies *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard), *Liriomyza sativae* Blanchard e *Liriomyza trifolii* (Burgess) se comportam como praga, atacando uma ampla variedade de plantas cultivadas e silvestres por todo o mundo (Spencer 1963, Spencer 1983, Spencer *et al.* 1992, Probst *et al.* 1999, Shiao 2004, Sappanukhro *et al.* 2010).

A taxonomia e sistemática da família Agromyzidae é complexa, principalmente no caso do gênero *Liriomyza*, pela sua semelhança morfológica (Stegmaier 1967). Dentre os muitos conceitos presentes na literatura, admite-se como complexo espécies crípticas um conjunto de duas ou mais espécies indistinguíveis por critérios morfológicos (pelo menos superficialmente) e que são ou foram classificadas como um único táxon (Bickford *et al.* 2007). Tais espécies apresentam divergência evolutiva recente, sendo separáveis apenas ao nível molecular, ocorre em simpatia, e apresentam isolamento reprodutivo (Bickford *et al.* 2007).

A genitália dos machos é fundamental para a determinação específica, no entanto, dada a semelhança de algumas espécies como *L. trifolii* e *L. sativae*, também se utiliza as formas das minas ou galerias como características distintivas das larvas (Spencer & Stegmaier 1973, Spencer *et al.* 1992, Étienne & Martinez 2003), a morfologia das minas representa uma característica forte na separação de algumas espécies de mosca minadora.

A correta identificação de um inseto de interesse econômico é premissa básica para a solução de qualquer problema entomológico, buscando facilitar a obtenção de toda informação bibliográfica previamente existente sobre o tema (Hebert 2003, Fujihara 2011). No entanto, a identificação desses minadores é normalmente feita com base apenas em caracteres morfológicos.

Estudos recentes têm constatado variações intraespecíficas, o que coloca em questionamento a validade de algumas espécies e a confiabilidade dos caracteres atualmente utilizados para diferenciá-los (Tixier *et al.* 2012).

A utilização exclusiva da morfologia pode ser limitante na identificação de espécies. Variações podem ser constatadas ao nível biológico e genético (Martin 2007), como a ocorrência de espécies crípticas, já observadas em Agromyzidae (Tixier *et al.* 2006). A utilização de uma abordagem integrativa, unindo o estudo das variações genéticas e morfológicas em complemento aos estudos morfométricos, tem auxiliado em estudos taxonômicos de minadores da família Agromyzidae, sobretudo na resolução de problemas taxonômicos, como a presença de espécies crípticas (Sheffer & Lewis 2001).

Sheffer & Lewis (2001) relataram variabilidade morfológica, diferença molecular ao nível de espécie concluindo que *L. huidobrensis* e *L. langei* se tratava de espécies crípticas. O objetivo deste trabalho foi confirmar o status taxonômico de populações mexicanas identificadas como *L. sativae*, *L. trifolii* e *L. commelinae*, conhecer a variabilidade entre as mesmas, e comparar geneticamente essas populações. Para isso, foi utilizada a integração de uma avaliação morfométrica, morfológica e molecular, utilizando o marcador Citocromo Oxidase I (COI).

Material e Métodos

Pesquisa de Campo. As amostragens foram realizadas em cultivos convencionais nos estados de Sinaloa, Oaxaca e Veracruz no México, de novembro de 2014 a fevereiro de 2015 (Tabela 1). Foram coletados exemplares adultos com o auxílio de um aspirador entomológico e na fase imatura, onde folhas que estavam minadas pelo inseto foram acondicionadas em sacos de papel N° 8, posteriormente depositadas em bandejas de polietileno, para coletas de pupas, e

posteriormente transferidas para placas de petri coberta com Filme plástico de PVC. Após a emergência dos adultos, os mesmos foram colocados em álcool 70%.

Caracterização Morfológica. A identificação foi realizada utilizando as chaves de Spencer (1963), Steyskal (1972), Spencer & Stegmaier (1973), Spencer & Steyskal (1986) (Tabela 01). Para extração e descrição morfológicas das genitálias se utilizou a metodologia de desenvolvida por Palacios- Torres *et al.* (2008). Separou-se o abdômen do resto do corpo do inseto, colocando-o dentro de uma solução de hidróxido de potássio (KOH) a 10%, a 80°C durante 20 minutos, lava-se com água destilada e em seguida colocou-se em álcool 70%. Foi realizado dois tipos de preparações, a primeira constitui montar exemplares do corpo completo, assim como o edeago e bomba ejaculatória e uma preparação temporal sobre uma gota de substância gelificante mesclada com uma gota de glicerina; a segunda consistiu em desidratar paulatinamente o edeago e a bomba ejaculatória com álcoois a 80%, 90% e 100% para em seguida aclará-los em xilol e montá-los em bálsamo Canadá.

Estruturas foram montadas sobre uma lamina imersa em gel transparente com glicerina, para que estas se mantivessem numa posição estável. O estudo e fotografias foram feitos com auxílio de um microscópio Tessorar e com um Foto microscópio III, ambos de Carl Zeiss®, com uma câmara digital para microscopia PaxCam3®.

Caracterização Morfométrica. Utilizou-se na análise 20 indivíduos fêmeas. As estruturas fotografadas foram as asas direitas dos exemplares, utilizando pinças entomológicas, montadas em lâminas semipermanentes com glicerina.

Foram escolhidos 15 marcos anatômicos das asas dos espécimes (Tabela 2), caracterizados por conexões e interseções que fornecem informações acerca das conformações das asas. Esses marcos foram escolhidos com base em trabalhos anteriores realizados com morfometria geométrica de asas de Diptera (Câmara *et al.* 2006, Ludosky *et al.* 2008, Frankuski *et al.* 2009,

Lyra *et al.* 2010; Tantowijoyo & Hoffmann 2011). Os marcos anatômicos de cada asa foram obtidos com a utilização de um software TPS Dig 2.17 (Rohlf 2010).

A ordem de introdução dos marcos foi a mesma para cada indivíduo, por ser este um requisito para estabelecer a homologia espacial das estruturas mediante suas coordenadas. Cada marco corresponde a uma coordenada em um plano cartesiano. A inserção dos marcos anatômicos encontra-se representada por uma matriz com 15 coordenadas X e 15 coordenadas Y no plano cartesiano.

Os dados foram computados os tamanhos dos centroides e as variáveis canônicas (VCs), com o auxílio dos programas de computador TpsUtil 1.29, TpsRelw 1.54 (QSC- James Rohlf), MorphoJ 1.06 e o R. As análises comparativas realizadas foram: as variáveis canônicas que descrevem apenas forma; as de tamanhos de centroide que descrevem apenas tamanho e a análise discriminante que classifica as observações desconhecidas e verifica quais as variáveis que possuem maior relevância para discriminar os grupos de interesse (Monteiro & Dos Reis 1999).

Os tamanhos dos centroides foram utilizados nas comparações de amostras par-a-par tendo sido efetuadas intra e interpopulacionalmente. As análises estatísticas bicaudais ao nível de rejeição 0,05% foram utilizadas baseadas nos tamanhos dos centroides. O teste estatístico de normalidade Kolmogorov-Smirnov e Normal Q-Q Plot foram utilizados para verificar se as amostras analisadas apresentavam distribuição Gaussiana (distribuição normal). O teste de Kruskal-Wallis para amostras de distribuição não-normal e para variância homogênea como também o programa estatístico R.

Para essas comparações também foi utilizado o cálculo das Distancias de Mahalanobis, que é uma distância linear, semelhante à distância Euclidiana, porem medida entre os pontos num espaço multidimensional.

Caracterização Genética. Para extração do DNA utilizou-se Chelex[®], em seguida as amostras foram guardadas a -20°C até o momento da reação de PCR. A região de DNA mitocondrial utilizada foi à porção final da citocromo oxidase subunidade I (COI), correspondente à região do DNA Barcode.

A amplificação dessa região foi obtida utilizando-se os primers HCO 2198-L (5'TAAACTTCWGGRTGWCCAAARAATCA-3') e LCO 1490-L (5' GGTCWACWAATCATAAAGATATTGG-3') (Nelson 2003). PCRs foram realizadas utilizando o Kit Mix Go Taq Colorless, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (Promega[®] Fitchburg, Wisconsin, USA).

A PCR foi realizada sobre as seguintes condições: 5 min a 94°C, cinco ciclos de 30 seg a 94°C; 1min a 50°C; 1min a 72°C; 35 ciclos de 30 seg a 94°C; 1min a 50°C; 1min a 72°C; depois 7min a 72°C, mantido a 4°C. Os resultados foram visualizados em gel de agarose a 1% em tampão, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador UV. Em seguida os amplicons foram purificados usando o kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega[®] Fitchburg, Wisconsin, USA) quantificados em NanoDrop[®] e posteriormente diluídos para 10ng/ul.

Cada amostra foi sequenciada duas vezes e a qualidade das reações foi avaliada com o auxílio do programa Pregap4 (Staden, 1996), onde as mesmas foram obtidas através do sequenciador automático ABI 3500XL, através do kit de sequenciamento Big Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Cleveland, Ohio, USA), com base nos valores de Phred30 (Ewing *et al.* 1998). As sequências de consenso foram obtidas utilizando o programa Gap4 (Staden 1996). O grau de confiabilidade de cada um dos nucleotídeos foi avaliado, utilizando-se valor de Phred 30 e analisadas no programa Pregap4 versão 1.6 do pacote de programas Staden Packagen[®] (Staden 1996).

As sequências foram identificadas através da busca por homologia contra sequências depositadas no GenBank, utilizando o programa BLASTn (Altschul 1990) para confirmação da especificidade dos produtos sequenciados. Todas as novas sequências produzidas serão depositadas no GenBank. O alinhamento múltiplo foi realizado utilizando o programa Muscle (Edgar 2004), incorporado ao programa MEGA 6.0, onde calculou-se a Matriz de Distância entre as espécies modelo Kimura 2 Parâmetros (Tamura *et al.* 2011).

Para a construção da árvore filogenética Neighbor-Joining, utilizando a metodologia de Kimura 2 Parâmetros foi utilizado o teste estatístico de suporte bootstrap com valor de 1000 pseudoreplicas aleatórias. Neste estudo, sequências já descritas de *L. huidobrensis* (LHKR476572.1), *L. sativae* (LSKF962575.1) e *L. trifolii* (LTEU219614.1) foram adicionadas para compor o conjunto de dados a fim de auxiliar na taxonomia molecular dos espécimes estudados.

Genética de Populações das Espécies de *Liriomyza*. A diversidade genética intra-populacional foi mensurada através da análise de diversidade haplotípica e nucleotídica, número de sítios polimórficos e número de transições e transversões, utilizando-se os softwares DNASP 5.0 (Rozas *et al.* 2003) e o Network 4.6 (www.fluxus-engineering.com). Realizou-se o teste de neutralidade D de Tajima que se baseia na distribuição das frequências de mutação e na distribuição de haplótipos, distinguindo as diferenças entre as sequências de DNA evoluindo aleatoriamente ("neutra") e daquelas que evoluem no âmbito de um processo não aleatório.

Foram feitas análises quanto ao nível de diferenciação genética com base no índice de fixação F_{st} de forma pareada entre as populações usando o software DnaSP 5.0 (Rozas *et al.* 2003). O número médio de substituições por sítios entre as populações (D_{xy}), o número total de substituições por sítios entre as populações (D_a), número de polimorfismos compartilhados entre as populações pareadas (S_s) e o número de diferenças fixadas entre as populações pareadas (S_f)

foram calculados no software DNASP 5.0 (Rozas *et al.* 2003). A rede de haplótipos foi gerada através do software Network 4.6, utilizando o método Median-joining (Bandelt *et al.* 1999) para verificar o nível de compartilhamento e a frequência de distribuição dos haplótipos entre as populações.

Resultados e Discussão

Pesquisa de Campo. A identificação dos exemplares apontou uma elevada representatividade de duas espécies do gênero *Liriomyza*: *L. sativae*; *L. trifolii* coletadas nos estados de Sinaloa e Oaxaca. Na coleta realizada no estado de Veracruz todos os espécimes coletados corresponderam a *L. commelinae* (Tabela 1).

Caracterização Morfológica *Liriomyza. sativae*. Exemplares coletados em feijão (*Phaseolus vulgares*) e grão-de-bico (*Cicer arietinum*) (Tabela1). Descrição: A cabeça apresenta dois pares de cerdas fronto-orbitais superiores e dois pares de cerdas fronto-orbitais inferiores. Sedas orbitais escassas e distinguíveis. Os dois pares de cerdas verticais estão inseridas, sendo uma sobre a cutícula de cor amarela e outra sobre a cor negra. Antena com o terceiro segmento de forma arredondada e com presença de pubescência, arista escura e com pubescência. Gena 1/3 da altura dos olhos. Ambos os sexos apresentam os olhos glabros (Fig. 1A). O anepisterno é predominantemente amarelo, com área em preto e a interna pode variar de tamanho, desde de uma barra pequena ao longo da margem inferior a uma área ao longo de toda a margem inferior (Fig.1B).

O mesonoto apresenta 3+1 pares de cerdas dorso-central com quatro fileiras de sedas. Possui coloração variando de cor marrom escuro brilhante a preto brilhante, com o escutelo de coloração amarela as extremidades de cor amarela (Fig. 1C). Essa espécie possui frente, antena, orbitas oculares e halteres amarelos, com o triangulo ocular, arista, tíbias e tarsos, caliptra,

margem da caliptra e franja negra. O comprimento da asa varia de 1,3 a 1,7 onde a nervura costal se estende até a M1+2 em ambos os sexos. O abdômen possui tergitos de coloração marrom, sendo que o segundo tergito é dividido por uma faixa amarela (Fig. 1D).

A vista lateral do edeago é caracterizada por possuir um distíalo da cutícula de coloração clara, com bandas esclerosadas em suas bordas superior e inferior, termina em uma abertura ampla. A vista ventral o distíalo apresenta uma constrição notória, as bordas do distíalo tem somente uma ligeira ondulação (Figs. 2A, B e 3A). A bomba ejaculadora apresenta o apodema com uma base delgada que em seu extremo distal é bem mais larga que o diâmetro do bulbo, de coloração marrom (Fig. 3B).

Liriomyza trifolii. Amostras coletadas em pimenta (*Capsicum annuum* L.) e tomate de cáscara ou tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot) (Tabela 1). Esta espécie já foi relatada anteriormente no país, na lista de espécies de Agromyzidae publicada por Martinez & Étienne (2002a). Descrição: Cabeça apresenta frente e orbitas ocelares completamente amarelas, com dois pares de cerdas fronto-orbitais superiores e dois pares de cerdas fronto-orbitais inferiores. Sedas orbitais escassas e distinguíveis. Os dois pares de cerdas verticais inseridas sobre a cutícula de cor amarela (Fig. 1A).

A antena apresenta todos seus segmentos amarelos de forma arredondada e com presença de pubescência, arista escura e com pubescência. Gena 1/3 da altura dos olhos. Ambos os sexos apresentam os olhos glabros. O anepisterno é amarelo, com marca preta acinzentada na margem inferior (Fig. 1B). O mesonoto apresenta coloração marrom com aparentes listras de coloração mais escuras (Fig. 1C), com 3+1 pares de cerdas dorso-centrais e quatro fileiras de sedas. O abdômen possui tergitos com faixas incompletas coloração que varia de marrom claro a alaranjado com as bordas de cor amarela, sendo o 1^o, 3^o e 6^o tergitos com faixas únicas e os demais são divididos por uma faixa de coloração amarela (Fig. 1D).

As asas possuem 1.3 a 1,7mm de comprimento onde a nervura costal se estende até a M1+2 em ambos os sexos. Frente, antena, órbitas oculares, escutelo e halteres são de cor amarela. Triângulo ocular, arista, tíbias e tarsos, caliptra, margem da caliptra e franja de coloração preta.

Em vista lateral o distíalo apresenta cutícula clara, com bandas esclerosadas em suas bordas superior e inferior, termina em uma abertura ampla. O distíalo do edeago em vista ventral apresenta uma grande constrição em sua parte média e uma reentrância marcada longitudinal (Figs. 2A, B e 3A). A bomba ejaculadora tem uma haste delgada que se alarga na sua parte distal, sem exceder o diâmetro do bulbo de coloração variando de bege a marrom claro (Fig. 3B).

Liriomyza commelinae. Exemplares coletados em plantas de *Commelina diffusa* (Tabela. 1). Descrição: A cabeça possui cerdas verticais que estão inseridas sobre cutícula amarela. Antena do macho apresenta o terceiro segmento antenal maior, o mesonoto possui coloração café com as bordas amareladas (Fig. 1A). Anepisterno extensivamente amarelo (Fig. 1B). Tíbias e tarsos são castanho claro, um pouco mais escura que a fêmures amarelo.

O mesonoto apresenta coloração marrom com aparentes listras de coloração mais escuras não preenchendo todo o mesonoto (Fig. 1C), com 3+1 pares de cerdas dorso-centrais e quatro fileiras de sedas. O abdômen possui os 1^o, 2^o tergitos com faixas incompletas de coloração de marrom com as bordas amarela, o 3^o tergito possui faixa completa de cor marrom, o 4^o possui faixa completa de coloração de marrom com bordas amarela, com duas faixas verticais de coloração marrom escuro, o 5^o tergito possui uma mancha central de coloração marrom com duas faixas verticais de cor marrom escuro e o 6^o tergito possui uma mancha central de coloração marrom (Fig. 1D).

A asa tem 1.5 mm de longitude no macho e 1,8 mm em fêmeas. Caliptra acinzentada com a margem e franjas pretas. A vista lateral do edeago apresenta distíalo terminado em forma alongada de coloração mais clara que o resto do edeago. Na vista ventral observa-se um distíalo

com estruturas largas e separadas, estas apresentam a mesma largura. A parte média e a parte mais basal apresentam coloração escura (Fig. 3A). A bomba ejaculadora apresenta um talo curto e a sua parte distal se amplia drasticamente, com uma extremidade redonda e a outra forma pontiaguda (Fig. 3B).

As características de identificação foram baseadas na morfologia externa e interna das moscas minadoras (Spencer 1973, Spencer & Steyskal 1986, Spencer *et al.* 1992, Maharjan 2014, Torres *et al.* 2005). De acordo com o mapa de distribuição geográfica das pragas quarentenárias da Europa elaborado pela EPPO /CABI (Smith *et al.* 2009, Costa Lima *et al.* 2015), *L. trifolii* está presente em 97 países, *L. sativae* em 54 e *L. commelinae* em 8 (Torres *et al.* 2015).

O raio de dispersão natural de *L. trifolii* se estende dos estados no Norte dos Estados Unidos até o Golfo da Flórida (Spencer 1973, 1989), desde então diversos desequilíbrios populacionais são relatados na literatura (Harris & Tate 1933, Spencer 1989, Minkenberg & Lenteren 1986, Mcclanahan 1983, Spencer 1973, 1989, Muphy & LaSalle 1999, Cabi 2015, Costa Lima 2015).

No México há registros de *L. trifolii* na região Noroeste como também nos estados de Tamaulipas, Sinaloa e Oaxaca (Spencer 1983, Spencer & Steyskal 1986, Pacheco 1985, Alvarado & Trumble 1999, Étienne & Martínéz 2003b, Cortez *et al.* 2004, Palacios-Torres *et al.* 2008, Valenzuela-Escoboza *et al.* 2010, Palacios-Torres *et al.* 2015).

A espécie *L. sativae* foi primeiramente descrita na Argentina em 1938, nos estados do Sudeste dos Estados Unidos até a Califórnia, assim como no Caribe e na maior parte da América do Sul, desde então novos registros foram feitos ampliando sua área de distribuição (Spencer 1973).

Garcia-Palacios *et al* (2014) observaram a ocorrência de *L. sativae* no cultivo de pepino (*Cucumis sativus* L.) no estado de Veracruz e em tomate (*S. lycopersicum*) no estado de Morelos,

como também descreveram as diferenças morfológicas internas existentes entre as espécies de *L. trifolii* e *L. sativae* informações essas que corroboram com as citadas nesse trabalho.

Em 2014 no estado de Sinaloa foi relatado a ocorrência de *L. sativae* associado com grão de bico (*Cicer arietinum* L.) em Culiacan por Medina e colaboradores. Valenzuela-Escoboza *et al.* (2015) relataram a ocorrência de *L. sativae* em tomate (*Solanum lycopersicum* L.) nos municípios de Ahome, El Fuerte e Gusave localizados no norte de Sinaloa.

Palacios-Torres *et al.* (2015) relataram a ocorrência de *L. commelinae* no México nos estados de Oaxaca, Tezonapa e Veracruz. Sendo muito relevante essa informação, já que é o primeiro registro de uma espécie de Agromyzidae que se alimenta estritamente de monocotiledôneas, como também possui o habito de empupar na mina. Spencer & Steyskal (1986) indicam os gêneros *Commelina* e *Tradescantia* como as principais plantas hospedeiras dessa espécie.

Caracterização Morfométricas. Nas Tabelas 3 e 4 é possível observar os resumos das análises de tamanho de centroide e de conformação para as três espécies. Esses resultados são provenientes da ANOVA de Procrustes. Como o classificador de repetição não apresentou resultados significativos indica que não existem erros de marcação maiores do que o esperado ao acaso (Figs. 4A, B e C). Os demais resultados mostram que há grande diferença no que se refere à conformação e tamanho das asas entre as três espécies dentro do gênero *Liriomyza*, apresentando resultados muito significativos entre elas ($P < 0,0001$).

Na figura 5 é possível observar as descrições estatísticas da distribuição dos tamanhos de centroide alares, tais como médias, erros padrão e intervalos de confiança. Baseando-se nas análises de tamanho de centroide, percebe-se que dentre as três espécies, *L. commelinae* é a que possui o maior tamanho de asa, enquanto que as outras possuem tamanhos similares.

Como resultado das Tabelas 3 e 4 e da Figura 5, podemos observar que cada espécie possui características específicas, apresentando diferenças no que se refere à conformação e ao tamanho das asas.

Com a realização da CVA foram obtidas duas variáveis canônicas que explicam 100% da variação total das espécies, sendo o primeiro eixo suficiente para explicar 65% de toda a variação entre as espécies. Analisando esse gráfico (Fig. 6), podemos verificar a diferenciação de três grupos que correspondem a *L. commelinae*, *L. sativae* e *L. trifolii*. A definição é parcial entre as espécies, de modo que são passíveis de separação em relação aos eixos. *L. trifolii* e *L. commelinae* encontram-se associadas aos valores positivos e *L. sativae* aos valores negativos. As três encontram-se com uma pequena sobreposição, não sendo possível a definição total das espécies utilizando esses eixos canônicos.

Nos resultados obtidos com a análise de discriminação realizada com *L. commelinae*, *L. sativae* e *L. trifolii* observa-se através dos valores da distância de Mahalanobis (Tabela 5) que ocorre uma separação bem definida de todas as espécies com base nas combinações par a par entre elas. Os valores de p inferiores a 0,001 para cada combinação indicam que a separação dos grupos possui uma probabilidade muito baixa de ter ocorrido ao acaso, fundamentando a separação dos grupos.

Sabe-se que em Diptera, o tamanho da asa é geralmente proporcional ao tamanho do corpo e embora as reduções do número e/ou padrão de veias possam ser encontradas em asas com tamanhos menores, não há uma correlação precisa entre o padrão de veias e o tamanho das asas (De Celis & Diaz-Benjumea 2003). Quando se compara as espécies de Diptera pertencentes a uma mesma família ou a famílias diferentes, asas de dimensões muito distintas podem apresentar um padrão de veias quase idêntico (De Celis & Diaz-Benjumea 2003).

É possível perceber que a conformação alar total é muito similar para todas as espécies. Entretanto, variações de forma são bem evidentes entre as espécies trabalhadas. Isso se confirma para forma e tamanho, o que nos leva a crer que não há um fluxo gênico entre as populações. Como não se conhece ao certo quais são as bases genéticas determinantes desses caracteres alares, essas comparações não são estimativa precisa de fluxo gênico, mas ainda assim é um indicativo de que existe alguma diferenciação.

Existem evidências de que o formato alar possui herança quantitativa, pois em um dos seus trabalhos Jirakanjanakit *et al.* (2008), verificaram a característica herdável da forma alar em isolinhagens de *Ae. aegypti* através de sucessivas gerações. Já no tamanho alar, no entanto, pode estar relacionado a plasticidade devido a fatores ambientais (Jirakanjanakit *et al.* 2007).

Tantowijoyoa & Hoffmann (2010), relataram a influência de fatores como latitude e longitude influenciam em alterações nas características morfológicas em animais ectotérmicos devido a temperatura, portanto, o tamanho do corpo aumenta sob baixas temperaturas. Fatores como planta hospedeira pode contribuir para os padrões espaciais em tamanho, bem como, particularmente para insetos polívoros (Hoffmann *et al.* 2005).

Padrões de elevação para o tamanho do traço e da forma em duas espécies de mosca minadora foram examinados em *L. huidobrensis* e *L. sativae*, ao longo de um gradiente de altitude tropical em Java, Indonésia, onde observou-se complexas na forma de asa ao longo do gradiente e que as diferenças morfológicas foram influenciadas por efeitos genéticos e ambientais, refletindo no contexto da adaptação a diferentes altitudes nas duas espécies (Tantowijoyoa & Hoffmann *et al.* 2010).

A diferença no tamanho do corpo pode influenciar a capacidade de colonização das espécies segundo Hutchinson & MacArthur (1959), que sugeriram que espécies menores tendem a ser especializadas em relação ao hospedeiro e a faixa ambiental quando comparado com espécies

maiores. No caso de as duas espécies de moscas minadoras, *L. sativae* coloniza uma gama de hospedeiros mais estreita do que a elevação maior *L. huidobrensis*. O tamanho corporal maior em *L. huidobrensis* pode proporcionar maior resistência ao calor e tolerância ao frio em comparação com *L. sativae* (Huang & Kang 2007).

Insetos com tamanho maior do corpo têm uma melhor capacidade de conservar energia e isso pode aumentar a sua sobrevivência quando experimentam baixa temperatura (Jirakanjanakit *et al.* 2007). Sendo maior também beneficia a capacidade de um inseto para resistir a dessecação quando se lida com condição mais quente (Jirakanjanakit *et al.* 2008). Finalmente, tamanho maior do corpo pode beneficiar as taxas de movimento, especialmente se inseto tem asas relativamente mais longos em relação ao seu corpo (Gutierrez & Menendez 1997 & Hoffmann *et al.* 2007).

Em resumo, os resultados de morfometria alar podem significar diferenciação genética populacional, quando relacionados a forma alar ou uma plasticidade relacionada ao tipo de ambiente, ao se tratar do tamanho alar, já que as populações estudadas vivem sob diferentes condições ambientais, como em outros trabalhos já publicados (Gutierrez & Menendez 1997, Hoffmann *et al.* 2007, Jirakanjanakit *et al.* 2007, Jirakanjanakit *et al.* 2008, Jirakanjanakit & Dujardin 2005, Tantowijoyoa & Hoffmann *et al.* 2011).

Caracterização Genética. Como resultado do sequenciamento das amostras de adultos coletados foram obtidas 99 sequências nucleotídicas, correspondentes a um segmento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI), apresentando cromatogramas de picos bem definidos e valores de Phred superiores a 30. Os fragmentos das sequências obtiveram tamanho próximo a 600 nucleotídeos.

A busca por sequências homólogas no GenBank através do BLASTn mostrou similaridades de 99% para a espécie *L. sativae*, 98% para *L. trifolii* e ainda não existem sequências depositadas no banco para a espécie *L. commelinae*, indicando que os amplificadores

pertencem ao gene em questão. Após a obtenção das sequências homólogas, análises de Neighbor-Joining utilizando a metodologia de Kimura 2 Parâmetros foram realizadas com a finalidade de reconstruir as relações filogenéticas entre as espécies avaliadas e separar as espécies em clados monofileticos e agrupar as sequências nucleotídicas em três grupos, confirmando a existência de três (Fig. 7).

Através da identificação dos espécimes, foi possível observar a presença de representantes de uma família e três espécies *L. commelinae*, *L. sativae* e *L. trifolii*. O levantamento também mostrou que a espécie de *L. commelinae* obteve pouca abundância de espécimes (5,93 %), isso se deve ao fato de não ser considerada praga como também por ser considerada uma espécie de hospedeiro específico.

Para avaliar o poder de separação das espécies através do marcador utilizado (COI) foi elaborada uma matriz de distância genética utilizando-se o modelo Kimura 2 parâmetros (Tabela 6). A distância entre indivíduos da mesma espécie foi inferior ao limite dos 3%, confirmando que o marcador é bastante promissor para diagnosticar espécimes não identificadas através da taxonomia clássica e outros estudos desse nível de trabalho como previstos no trabalho de Hebert *et al.* (2003).

Isto representa a confirmação molecular de *L. sativae*, *L. trifolii* e *L. commelinae* no México, concluindo que estes minadores destrutivos continuam sua expansão geográfica dentro das Américas. Estudos ecológicos apontaram para uma maior representatividade das espécies *L. sativae* e *L. trifolii* nas localidades estudadas, fato este que se encontra em concordância com outros estudos sobre a fauna de Agromyzidae no território mexicano (Valenzuela-Escoboza *et al.* 2010, Palacios-Torres *et al.* 2015, Valenzuela -Escoboza *et al.* 2015).

As caracterizações de identificação realizadas nesta pesquisa não corroboram com os resultados obtidos no trabalho realizado por Maharjan *et al.* (2014), pois ocorre divergência entre os parâmetros de avaliação.

Genética de Populações das Espécies de *Liriomyza*. Em *L. commelinae* foram observados 684 sítios conservados, 3 sítios variáveis, 3 sítios informativos de parcimônia. *Liriomyza sativae* apresentou 7 sítios variáveis distribuídos entre cinco sítios informativos de parcimônia e dois singletons. Já em *L. trifolii* foram encontrados 15 sítios variáveis distribuídos em 7 sítios informativos de parcimônia e oito singletons, como demonstrado na Tabela 7.

As análises de diversidade intrapopulacional evidenciaram baixos níveis de diversidades nucleotídicas e haplotípica (Tabela 8), podendo estes resultados estar relacionados com interferências abióticas e bióticas no padrão evolutivo destas populações.

É possível observar o valor de divergência genética, estimado a partir do parâmetro F_{ST} . O maior valor de F_{ST} (0,52857) foi encontrado entre as populações de *L. sativae* LSGBZ e LSFJ, refletindo assim num alto grau de divergência genética entre essas populações, demonstrando uma possível influência do hospedeiro (Tabela. 9). Observa-se que entre as demais espécies ocorreu um moderado grau de divergência.

Foram observados também os valores de substituições por sítios quando realizado comparações entre populações, devido principalmente ao grande número de sítios conservados entre os indivíduos que compõem estas populações, contribuindo assim para falta de estruturação genética entre as populações estudadas. Outro parâmetro avaliado é a ausência de sítios compartilhados, que auxilia na explicação da falta de estruturação genética das populações (Tabela. 9).

Através da rede de haplótipos foi possível detectar a presença de 8 haplótipos nas populações de *L. sativae* (Fig. 8), onde o haplótipo H8 foi o mais frequente devido a presença de

todos os indivíduos da população LSGBZ se encontrarem nele entre as duas populações investigadas dessa espécie. Levando em consideração o tipo de hospedeiro, a população LSFJ apresentaram todos os demais sete haplótipos exclusivos. Através da árvore filogenética das populações de *L. sativae*, nota-se a influência do hospedeiro sobre a genética da mosca minadora, separando bem as populações em relação ao hospedeiro. (Fig. 9).

A análise de divergência genética obteve valor significativo entre as populações mexicanas de *L. sativae* ao ser utilizado o índice de fixação genética (F_{st}) para avaliar a diferenciação genética destas populações, apresentando uma divergência genética considerável entre estas populações quando comparadas com as outras, demonstrando uma provável relação hospedeiro-praga, como descrito em outros trabalhos (Pang *et al.* 2005, Li Ping *et al.* 2008).

Nas populações de *L. trifolii* foi detectado a presença de 16 haplótipos (Fig. 10), onde o haplótipo H1 foi o mais frequente devido a sua presença de espécimes das três populações investigadas. Observa-se nesse caso que os tipos de hospedeiros das populações apresentaram haplótipos exclusivos como H2, H3 e H4 (na população LTLB), H8 (na população LTLM), H9 e H10 (na população LMTMT). Os demais haplótipos compartilham informações entre eles. Árvore filogenética das populações de *L. trifolii* obtida por análise de Neighbor-Joining, confirma os dados acima onde não se observa influência do hospedeiro sobre a diversidade genética desses insetos praga (Fig. 11).

Scheffer *et al.* (2006), ao analisarem populações de *L. sativae* e *L. trifolii* distribuídas nas Filipinas através do DNA barcode, obtendo-se clados distintos para as duas espécies pertencentes a este gênero, resultados similares ao desta pesquisa, demonstrando assim a eficiência deste marcador molecular na caracterização das espécies que compõem este gênero de insetos de importância econômica.

A estrutura genética de uma população é influenciada não só pela sua história, mas também pelas características próprias de cada espécie. Uma estrutura genética fraca indica coesão das espécies, enquanto que uma estrutura genética forte está associada a uma fragmentação ou, em alguns casos, sugere a ocorrência de fenômenos de especiação (Kox *et al.* 2005). A redução da diversidade genética é comum em espécies invasoras, mas não é um fator limitante para o sucesso destas espécies. (Puillandre *et al.* 2008, Ahern *et al.* 2009).

Uma redução significativa na variação genética das espécies com status de insetos praga em novo habitat é associada com os padrões evolutivos ao efeito fundador segundo a literatura, o qual pode influenciar na sobrevivência, além de causar alterações nos traços fenotípicos e no potencial adaptativo dos mesmos (Baliraine *et al.* 2004, Puillandre *et al.* 2008, Ahern *et al.* 2009, Tooman *et al.* 2011, Ferreira 2014).

A identificação correta de uma espécie é essencial para que seu correto manejo seja realizado, principalmente quando esta espécie é de importância econômica como as espécies estudadas *L. sativae* e *L. trifolii*. Nosso trabalho mostrou a relevância do uso do DNA barcode como uma ferramenta bastante eficiente na identificação molecular das populações de *Liriomyza*, ampliando o conhecimento biogeográfico desta espécie.

Literatura citada

- Ahern, R.G., D.J. Hawthorne & M.J. Raupp. 2009.** Founder effects and phenotypic variation in *Adelges cooleyi*, an insect pest introduced to the eastern United States. *Biol. Inv.* 11: 951–971.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers & D.J. Lipman. 1990.** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-10.
- Alvarado, R. B. and J.T. Trumble. 1999.** El manejo integrado de las plagas: un ejemplo en el cultivo de tomate en Sinaloa. *Hortalizas, plagas y enfermedades.* Edit. Trillas. 435-449.

- Baliraine, F.N., Bonizzoni, M. & Guglielmino, C.R. 2004.** Population genetics of the potentially invasive African fruit fly species, *Ceratitis rosa* and *C. fasciventris* (Diptera: Tephritidae). *Mol. Ecol.* 13: 683–695.
- Bandelt, H.J. & F.P. Rohl. 1999.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37-48.
- Bickford, D., D.J. Lohman, Navjot, S.S., Peter, K.L.N., R. Meier, K. Winker & K. Krista. 2007.** Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 22
- Camara, M., Caro-Riaño, H., Ravel, S., Dujardin, J.P., Hervouet, J.P., De Meeus, T., Kagbadouno, M.K., Bouyer, J. & P. Solano. 2006.** Genetic and morphometric evidence population isolation of *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera: Glossinidae) on the Loos Island, Guinea. *J. Med. Entomol.* 43: 853-860.
- Cabi. *Liriomyza trifolii* (American serpentine leafminer). Wallingford, 2015.** Disponível em: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/30965>. Acesso em: 27 de maio de 2016.
- Costa-Lima T.C., A.C. Silva & J.R.P. Parra. 2015.** Moscas-minadoras do gênero *Liriomyza* (Diptera: Agromyzidae): aspectos taxonômicos e biologia. Série Documentos. Petrolina: Embrapa Semiárido, 36p.
- Cortez, M. E., N. Castillo T. & J. Macias C. 2004.** Enemigos naturales para el control biologico de insectos plaga en canola. INFAP-CIRNO-CEVAF. Folleto Tecnico. 22: 18-22.
- De Celis, J.F. & F.J. Diaz-Benjumea. 2003.** Developmental basis for vein pattern variations in insect wings. *Int. J. Dev. Biol.* 47: 653-663.
- Edgar, R.C. 2004.** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32: 1792-1797.
- Étienne, J. & M. Martínez. 2003.** Les Agromyzidae de l'île de Saint-Christopher (Saint-Kitts) aux Antilles (Diptera). *Bull. Soc. Entomol. Fr.* 108: 89-95.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C. & P. Green. 1998.** Base-calling of automated sequencer traces using Phred. *Genome Res.* 8: 175-185.
- Francuski, L., Vujic, A., Ludoski, J. & V. Milankov. 2009.** Identification of the species *Cheilisia variabiles* group (Diptera: Syrphidae) from the Balkan Peninsula using wing geometric morphometrics, with the revision of status of *C. melanopa* Vujic, 1996. *Contri. Zool.* 78: 129-140.
- Ferreira, E.C.B.F. 2014.** Estrutura genética de populações naturais de *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae). Dissertação de Mestrado, UFRPE, RECIPE. 78p.
- Fujihara, R.T., L.C. Forti, M.C. Almeida & E.L.L. Baldin. 2011.** Insetos de importância econômica: guia ilustrado para identificação de famílias. Botucatu, FEPAF Editora, 391p.

- Gutierrez D, Menendez R. 1997.** Patterns in the distribution, abundance and body size of carabid beetles (Coleoptera: Caraboidea) in relation to dispersal ability. *J. Biogeogr.* 24: 903-914.
- Harris, H.M.; Tate, H.D. (1933)** A leafminer attacking the cultivated onion. *J. Econ. Entomol.* 26: 515-516.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball & J.R. Dewaard. 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 270: 313-321.
- Hoffmann, A.A., Woods, R.E., Collins, E., Wallin, K., White, A. & J.A. McKenzie. 2005.** Wing shape versus asymmetry as an indicator of changing environmental conditions in insects. *Aust. J. Entomol.* 44: 233-243.
- Hoffmann, A.A. et al. 2007.** Antagonistic selection between adult thorax and wing size in field released *Drosophila melanogaster* independent of thermal conditions. *J. Evol. Biol.* 20: 2219-2227.
- Huang, L.H. & L. Kang. 2007.** Cloning and interspecific altered expression of heat shock protein genes in two leafminer species to thermal stress. *Insect Mol. Biol.* 16: 491-500.
- Hutchinson, G.E. & R.H. MacArthur. 1959.** A theoretical ecological model of size distributions among species of animals. *Am. Nat.* 93:117-125.
- Kamiji, T. & R. Iwaizumi. 2013.** Four Species of Agromyzidae (Diptera) Intercepted by Japanese Import Plant Quarantine. *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 49: 53-61.
- Jirakanjanakit, N. & J.P. Dujardin. 2005.** Discrimination of the *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) laboratory lines based on wing geometry. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 36: 858-861.
- Jirakanjanakit, N., Leemongsawat, S., Thongrunkiat, C., Apiwathnasorn, S., Singhaniyom, C., Bellec, C. & J.P. Dujardin. 2008.** Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti* *Trop. Med. Int. Health* 12: 1354-1360.
- Kox, L.F.F., H.E.V.D., Beld, B.L. Lindhout & L.J.W. Goffau. 2005.** Identification of economically important *Liriomyza* species by PCR-RFLP analysis. *EPPO Bull.* 35: 79-85.
- Li-ping, W., Yu-zhou, D., Ya-ting, H., Fu-shan, Z. & L. Zi-qiang. 2008.** Genetic variation of host populations of *Liriomyza sativae* Blanchard. *Agric. Sci. China* 7: 585-590.
- Lyra, M.L., Hatadani, L.M., De Azeredo-Espin, A.M.L. & L.B. Klaczko. 2010.** Wing morphometry as a tool for correct identification of primary and secondary New World screwworm fly. *Bull. Entomol. Res.* 100: 19-26.

- Ludoski, J., Francuski, L., Vujic, A. & V. Milankov. 2008.** The *Cheilosia canicularis* group (Diptera: Syrphidae): species delimitation and evolutionary relationships based on wing geometric morphometrics. *Zootaxa* 1825: 40-50.
- Maharjan, R., Hyun Woo Oh & C. Jung. 2014.** Morphological and genetic characteristics of *Liriomyza Huidobrensis* (Blanchard) (Diptera: Agromyzidae) infesting potato crops in Korea. *J. Asia Pac. Entomol.* 17: 281-286.
- Martin, K.J. 2007.** Introduction to molecular analysis of ectomycorrhizal communities. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71: 601-610.
- Martínez, M. & J. Étienne. 2002.** Liste systématique et biogéographique des agromyzidae (Diptera) de la région neotropicale. *Boll. Zool. Agr. Bachic. Ser. II.* 34: 25-52
- Mcclanahan, R.J. 1983.** Control of *Liriomyza trifolii* on greenhouse chrysanthemums. *IOBC-WPRS Bulletin, Dijon Cedex 6:* 116-123.
- Minkerbeg, O.P.J.M. & J.C. Van Lenteren. 1986.** The leafminers *Liriomyza bryoniae* and *L. trifolii* (Diptera: Agromyzidae), their parasites and host plants: a review. *Agric. Univ. Wageningen Pape 86:* 1-50.
- Monteiro, L.R. & S.F. Dos Reis. 1999.** Princípios de morfometria geométrica. Holos Editora, Ribeirão Preto, 189p.
- Murphy, S.T. & J. Lasalle. 1999.** Review article: balancing biological control strategies in the IPM of new world invasive *Liriomyza* leafminers in field vegetable crops. *Bioc. News Inf.* 20: 91-104.
- Pang, B.P., Cheng, J.A., Huang, E.Y. & Z.S. Bao. 2005.** Effects of different host plants on population parameters of *Liriomyza sativae*. *Pl. Prot.*31: 26-28.
- Parrella, M. P. 1987** Biology of *Liriomyza*. *Annu. Rev. Entomol.* 32: 201–224.
- Pacheco, M. F. 1985.** Plagas de los cultivos agrícolas en Sonora y Baja California. SARH-INFAP-CIANO-CAEVY. Libro Tecnico. N°1 Cd. Obregón, Sonora, Méx. 414p.
- Palacios Torres, R.E., J. Romero N., J. Étienne., J.L. Carrillo., J.M. Valdez C., H. Bravo M., S.D. Koch., V. López M. & A.P. Terán V. 2008.** Identificación distribución y plantas hospedeiras de diez especies de agromyzidae (Insecta: Diptera), de interés agronómico en México. *Acta Zool. Mex.* 24: 7-32.
- Palacios Torres, R.E., Valdez Carrasco, J., Raymundo Medina, R., Valenzuela Escoboza, F. A. & A. Castañeda Vildozola. 2015.** Plantas hospederas y biogeografía de *Liriomyza brassicae* y *L. trifolii* y primer registro de *L. commelinae* (Diptera: Agromyzidae) en México. *Southwest. Entomol.* 40:205-215.

- Probst, K., L. Pülschen, J. Sauerborn & C.P.W. Zebitz. 1999.** Influencia de varios regímenes de uso de plaguicidas sobre la entomofauna de tomate en las tierras altas de Ecuador. *Man. Integr. Plagas* 54: 53-62.
- Puillandre, N., Dupas, S.O., Dangles, J.L., Zeddani, C., Apdevielle-Dulac, K., Barbin, M., Leguizamón, M.T. & J.F. Silvain. 2008.** Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. *Biol. Inv.* 10: 319 - 333.
- Sappanukhro, P., Petcharat, J., Nualsri, J. & S. Permkam. 2010.** Identification of *Liriomyza* spp. (Diptera: Agromyzidae) on yardlong bean and cucumber in Songkhla province: I. Feeding tunnel patterns, external morphology and male distipallus morphology. *J. Agric. Tech.* 6: 257-267
- Scheffer, S.J. & M.L. Lewis. 2001.** Two nuclear genes confirm mitochondrial evidence of cryptic species within *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94: 648-653.
- Scheffer S.J., Lewis M.L. & R.C. Joshi. 2006.** DNA barcoding applied to invasive leafminers (Diptera: Agromyzidae) in the Philippines. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 99: 204-210.
- Shiao, S.F. 2004.** Morphological diagnosis of six *Liriomyza* species (Diptera: Agromyzidae) of quarantine importance in Taiwan. *Appl. Entomol. Zool.* 39: 27-39
- Smith, M.A., J.J. Rodriguez, J.B. Whitfield, A.R Deans, D.H. Janzen, W. Hallwachs & P. D. Hebert. 2009.** Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology, and collections. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 34: 12359-12364.
- Spencer, K.A. 1963.** A synopsis of the neotropical agromyzidae (Diptera). *Trans. R. Ent. Soc. Lond.* 115: 291-389.
- Spencer, K.A. & C.E. Stegmaier. 1973.** Agromyzidae of Florida, with a supplement on species from the caribbean. arthropods of Florida and neighboring land areas. Florida Department of Agriculture and Consumer Services. Gainesville, Florida, U.S.A. 205p.
- Spencer, K.A. 1983.** Leaf mining agromyzidae (Diptera) in Costa Rica. *Rev. Biol.Trop.* 31: 41-67.
- Spencer, K. A. & J. C. Steyskal. 1986.** Manual of the agromyzidae (Diptera) of the United States. U.S. Department of Agriculture. Washington. D. C. Agric. Handb. 638p.
- Spencer, K.A., M. Martínez & J. Étienne. 1992.** Les Agromyzidae (Diptera) de Guadeloupe. *Annls Soc. Ent. Fr.* 28: 251-302.
- Steyskal, G.C. 1972.** The dipterous fauna of the heads of *Bidens pilosa*. *Flo. Ent.* 55:87-88.

- Stegmaier, C.E. 1967.** *Liriomyza commelinae*, A leaf miner on *Commelina* in Florida (Diptera, Agromyzidae). Fla. Entomol. 49:147-149.
- Rozas, J., J.C. Sánchez-DelBarrio, Messeguer, X. & R. Rozas. 2003.** DnaSP, DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods. Bioinformatics 19: 2496-2497.
- Rohlf, F.J. 2010.** TPSRelw, relative warps analysis. Computer program. Version 1.49. Department of ecology and evolution, State University of New York at stony brook, New York. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>. Acesso: Janeiro de 2016.
- Rohlf, F.J. 2010.** TPSDig. Computer program. Version 2.16. Department of ecology and evolution, State University of New York at stony brook, New York. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>. Acesso: Janeiro de 2016.
- Rohlf, F.J. & L.F. Marcus. 1993.** A revolution in morphometrics. Trends Ecol. Evol. 8: 29-132. SAS Institute Inc. 2008. JMP. Computer Program. Version 8.0. SAS Institute Inc.
- Tajima, F. 1989.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123:585-595.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar. 2011.** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28: 2731-2739.
- Tantowijoyo, W. & A.A. Hoffmann. 2011.** Identifying factors determining the altitudinal distribution of the invasive pest leafminers *Liriomyza huidobrensis* and *L. sativae*. Entomol. Exp. Appl. 135: 141-153.
- Tixier, M.-S., S. Kreiter, F. Ferragut & B. Cheval. 2006.** The suspected synonymy of *Kampimodromus hmiminai* and *Kampimodromus adrianae* (Acari: Phytoseiidae): morphological and molecular investigations. Can. J. Zool. 84: 1216-1222.
- Tixier, M.-S., M. Okassa & S. Kreiter. 2012.** An integrative morphological and molecular diagnostics for *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae). Zool. Scr. 41: 68-78.
- Tooman, L.K., Rose, C.J., Carraher, C., Suckling, D.M., Paquette, S.R., Ledezma, L.A. & R.D. Newcomb. 2011.** Patterns of mitochondrial haplotype diversity in the invasive pest *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae). J. Econ. Entomol. 104: 920-932.
- Valenzuela-Escoboza, F.A., Reyes, O. A., Cortez, M.E., Bautista, M.N. Lomelí, J.RF., Torres, R.E. P. & C.A.P. Mondaca. 2015.** Identification of leaf miner and its parasitoids in tomato crops in northern Sinaloa, Mexico. Southwest. Entomol. 40:3.
- Valenzuela-Escoboza, F.A., N.B. Martínez, J.R.L. Flores, E.C. Mondaca & J.V. Carrasco. 2010.** Natural parasitism of leaf miner *Liriomyza trifolii* (Burgess) in jalapeño pepper in Northern Sinaloa, México. Southwest. Entomol. 35: 569-572.

Wang, S., Lei, Z., Wang, H., Dong, B. & B. Ren. 2011. The complete mitochondrial genome of the leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). *Mol. Biol. Rep.* 38: 687-692

Wilson, A. C., R. L. Cann, M. George, U.B. Gyllensten, K.M. Helmbychowski, R. G. Higushi E.M. Palumbi, R.D. Sage & M. Stoneking. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* 26: 375-400.

Tabela 1. Locais de coleta de amostras vegetais no México.

Estados	Município	Coordenadas Geográficas	Hospedeiros	N	Espécies	SIGLAS
Veracruz	Tlacotalpan	18°37'00" N 95°40'00" O	<i>Commelina difusa</i>	60	<i>Liriomyza commelinae</i>	LC
Oaxaca	Loma Bonita	18°06'00" N 95°53'00" O	Pimenta (<i>Capsicum annuum</i> L.)	268	<i>Liriomyza trifolii</i>	LTLB
	Gusave	25°45'36" N	Feijão (<i>Phaseolus vulgares</i>)	80	<i>Liriomyza sativae</i>	LSFJ
Sinaloa		108°56'13" O	Grão de bico (<i>Cicer arietinum</i>)	195	<i>Liriomyza sativae</i>	LSGBZ
	Ahome	25°52'16" N	Pimenta (<i>Capsicum annuum</i>)	290	<i>Liriomyza trifolii</i>	LTLM
		109°00'48" O	Tomate de cáscara ou tomatillo (<i>Physalis ixocarpa</i> Brot.)	118	<i>Liriomyza trifolii</i>	LTTMT

Tabela 2. Descrição dos marcos anatômicos das asas dos espécimes pertencentes a quatro espécies de Agromyzidae.

Descrição dos Marcos	
Marco 1	Intersecção entre as veias C e h
Marco 2	Intersecção entre as veias C e R ₁
Marco 3	Intersecção entre as veias C e R ₂₊₃
Marco 4	Intersecção entre as veias C e R ₄₊₅
Marco 5	Intersecção entre as veias M ₁₊₂
Marco 6	Intersecção entre as veias C _u A ₁
Marco 7	Intersecção entre as veias h e R
Marco 8	Bifurcação entre as veias R e R ₂₊₃
Marco 9	Intersecção entre as veias R ₂₊₃ e R ₄₊₅
Marco 10	Intersecção entre as veias R ₄₊₅ e r-m
Marco 11	Intersecção entre as veias M e r-m
Marco 12	Intersecção entre as veias M e bm-cu
Marco 13	Intersecção entre as veias C _u A ₁ e bm-cu
Marco 14	Intersecção entre as veias A ₁ e C _u A ₂
Marco 15	Intersecção entre as veias C _u A ₁ e bm

Tabela 3. Resumo da análise de tamanho do centroide pela ANOVA de Procrustes entre fêmeas das espécies *Liriomyza sativae*, *Liriomyza trifolii* e *Liriomyza commelinae*. Os classificadores extraídos dos dados foram indivíduos (espécie) e residual. Sendo que SQ representa as somas dos quadrados, QM os quadrados médios e GL os graus de liberdade.

Classificador	SQ	QM	GL	F	P
Individuo	1619244,969855	809622,484927	2	44,93	<0,0001
Residual	1027171,844954	18020,558683	57		<0,0001

Tabela 4. Resumo da análise de conformação pela ANOVA de Procrustes entre as fêmeas de *Liriomyza sativae*, *Liriomyza trifolii* e *Liriomyza commelinae*. Os classificadores extraídos dos dados foram indivíduos (espécie) e residual. Sendo que SQ representa as somas dos quadrados, QM os quadrados médios e GL os graus de liberdade.

Classificador	SQ	QM	GL	F	P	Pillai tr.	P(param.)
Individuo	0,432	0,008	52	1,43	0,02	0,01	0,1515
Residual	8,628	0,005	1482				

Tabela 5. Resumo da análise discriminante par a par para as espécies de *Liriomyza sativae*, *Liriomyza trifolii* e *Liriomyza commelinae*.

PAR	Distância de Mahalanobis	Probabilidades
S – T	2,0191	<0,001
S – C	2,3550	<0,001
T – C	1,8145	<0,001

Tabela 7. Diversidade de espécies de *Liriomyza* do México.

	Sítios Conservados	Sítios Variáveis	Informativo Parcimônia	Singletons
<i>Liriomyza commelinae</i>	684	3	3	-
<i>Liriomyza sativae</i>	555	7	15	2
<i>Liriomyza trifolii</i>	595	15	7	8

Tabela 8. Testes de neutralidade e intra-populacionais medidas de diversidade genética para cada amostra.

Espécies	Populações	Tajima's D	N ¹	Hd ²	π ³	NS ⁴	H ⁵	K ⁶
	LSGBZ	-0,44680	15	0,82857	0,00336	7	8	1,88571
<i>Liriomyza</i>								
<i>sativae</i>	LSFJ	0,00000	16	0,00000	0,00000	1	1	0,00000
	LTLB	-1,98199	18	0,40523	0,00221	10	5	1,30719
<i>Liriomyza</i>	LTLM	0,25845	16	0,68333	0,00274	5	5	1,62500
<i>trifolii</i>	LTTMT	0,00918	13	0,80769	0,00272	15	5	1,61536

¹N: tamanho da amostra.

²Hd: diversidade haplotípica.

³ π : diversidade de nucleotídeos.

⁴NS: Número de sítios polimórficos.

⁵H: haplótipos.

⁶K: número médio das diferenças de nucleótidos.

Tabela 9. Diferenciação genética entre populações de *Liriomyza*.

Populações	Da ¹	Dxy ²	Kxy ³	Fst	Ss ⁴	Sf ⁵
LSGBZ x LSFJ	0,00188	0,00356	2,00000	0,52857	0	0
LTLB x LTTMT	0,00211	0,00458	2,72222	0,46143	0	1
LTLB x LTLM	0,00035	0,00280	1,66667	0,12323	0	0
LTLM x LTTMT	0,00074	0,00347	2,06250	0,21445	0	4

¹Da: Número líquido de substituições por sítios entre as populações.

²Dxy: Número médios de substituições nucleotídicas por sítios entre os dois grupos.

³Kxy: Diferença média de nucleotídeos par a par entre dois grupos.

⁴Ss: Sítios compartilhados.

⁵Sf: Sítios fixados

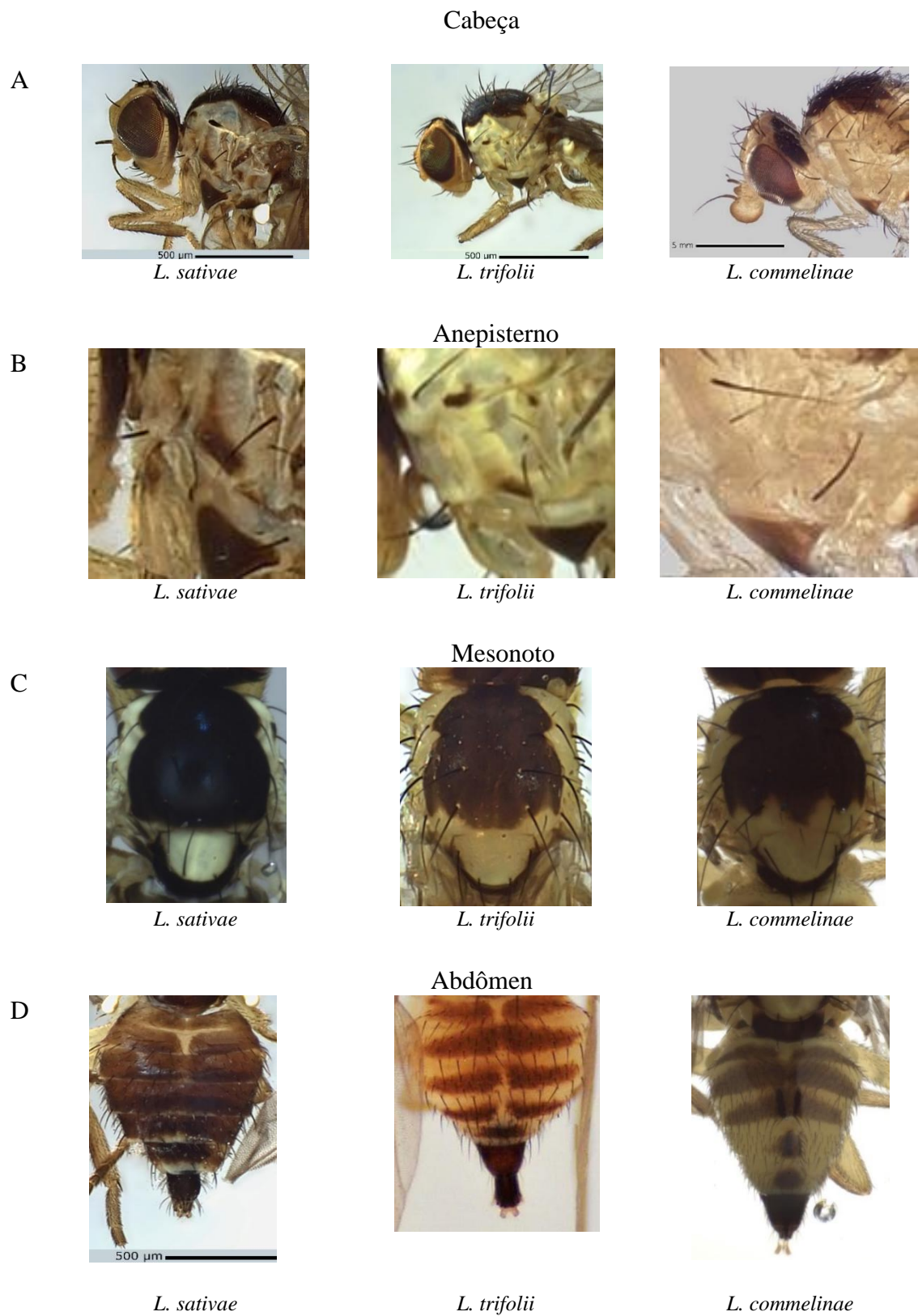


Figura 1. Características morfológicas das espécies de *Liriomyza* A – Cabeça. B - Anepisterno. C – Mesonoto. D - Tergitos abdominais. Foto: Sombra, K.D.S. 2016.

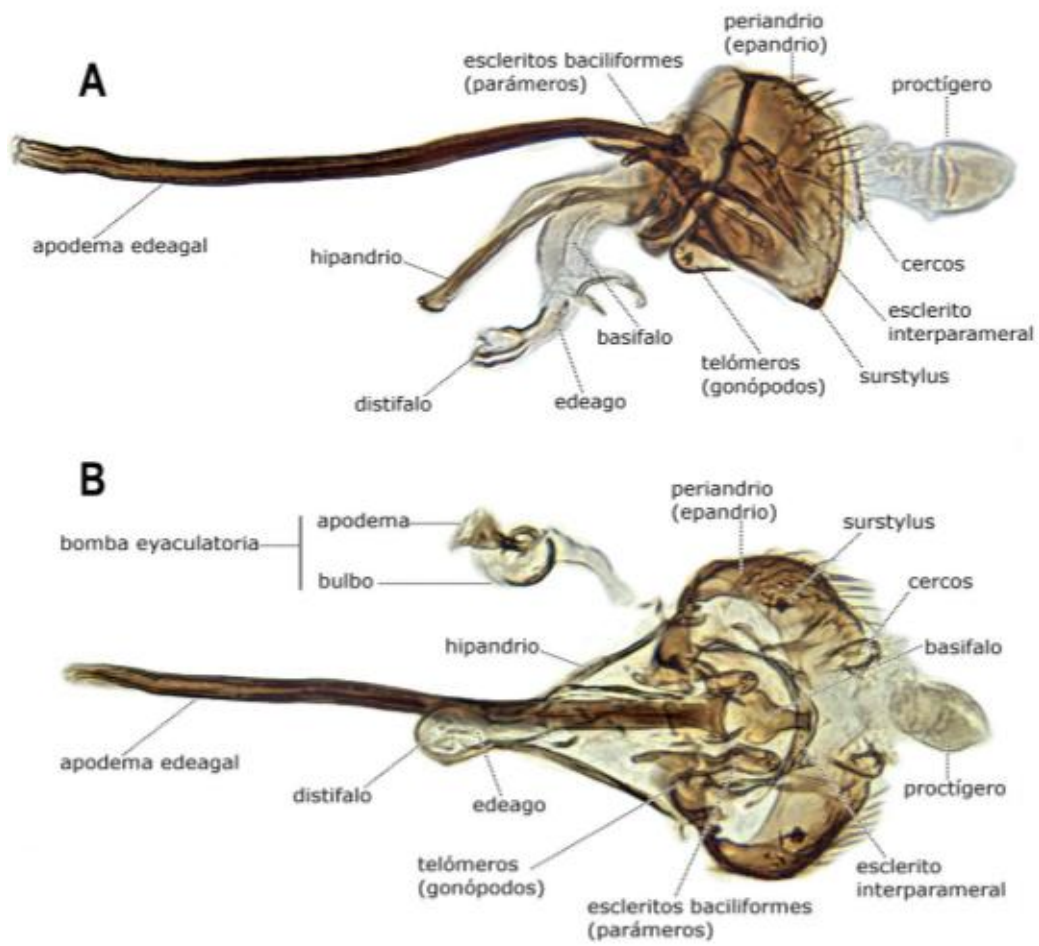


Figura 2. Morfologia da genitália do macho de *L. trifolii*. A - Vista lateral. B - Vista ventral. Foto: Garcia Palacios, 2011

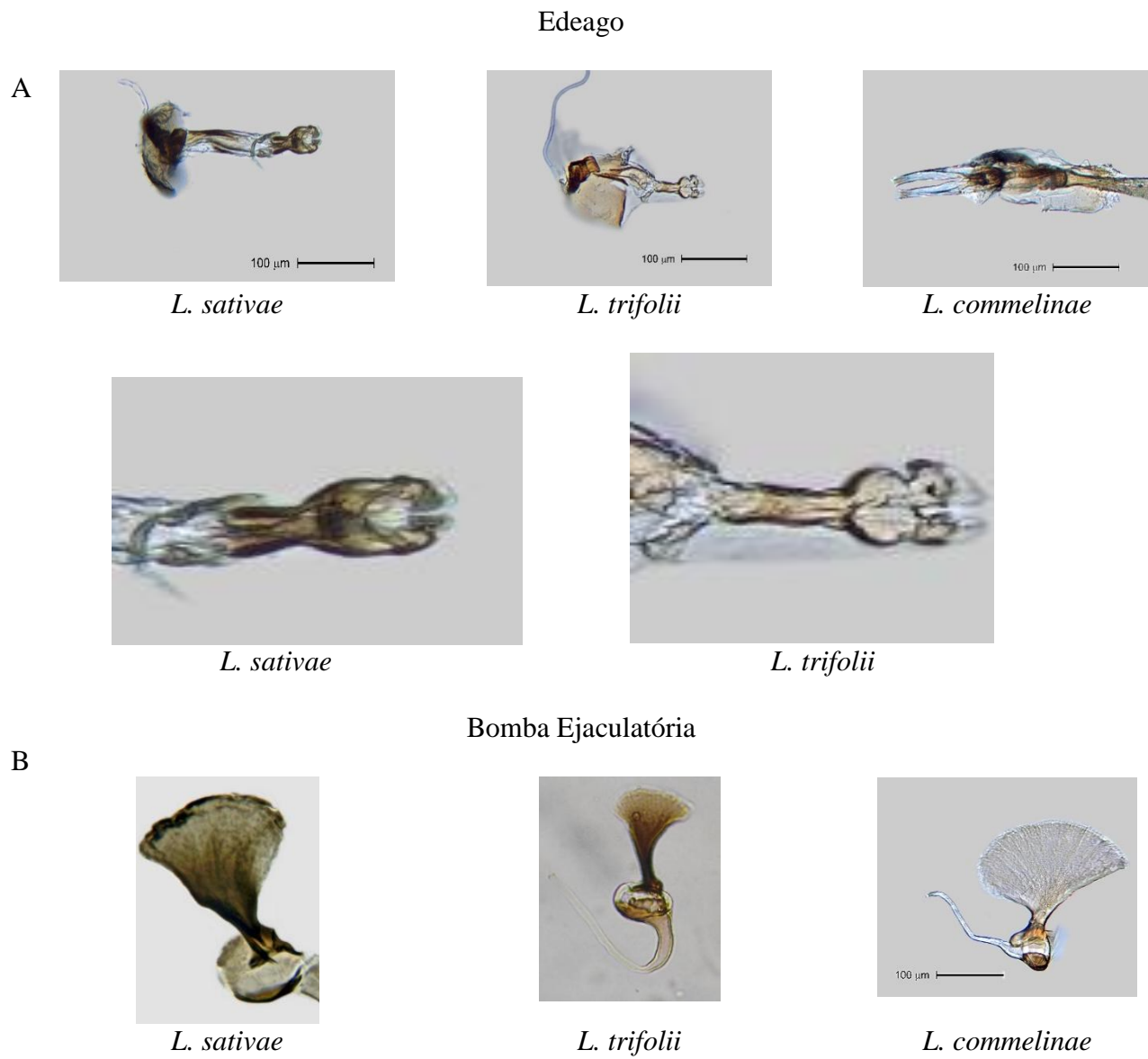


Figura 3. Características morfológicas das espécies de *Liriomyza*. A - *Distiphalus* do macho adulto. B - Bomba ejaculatória do macho adulto a 100un

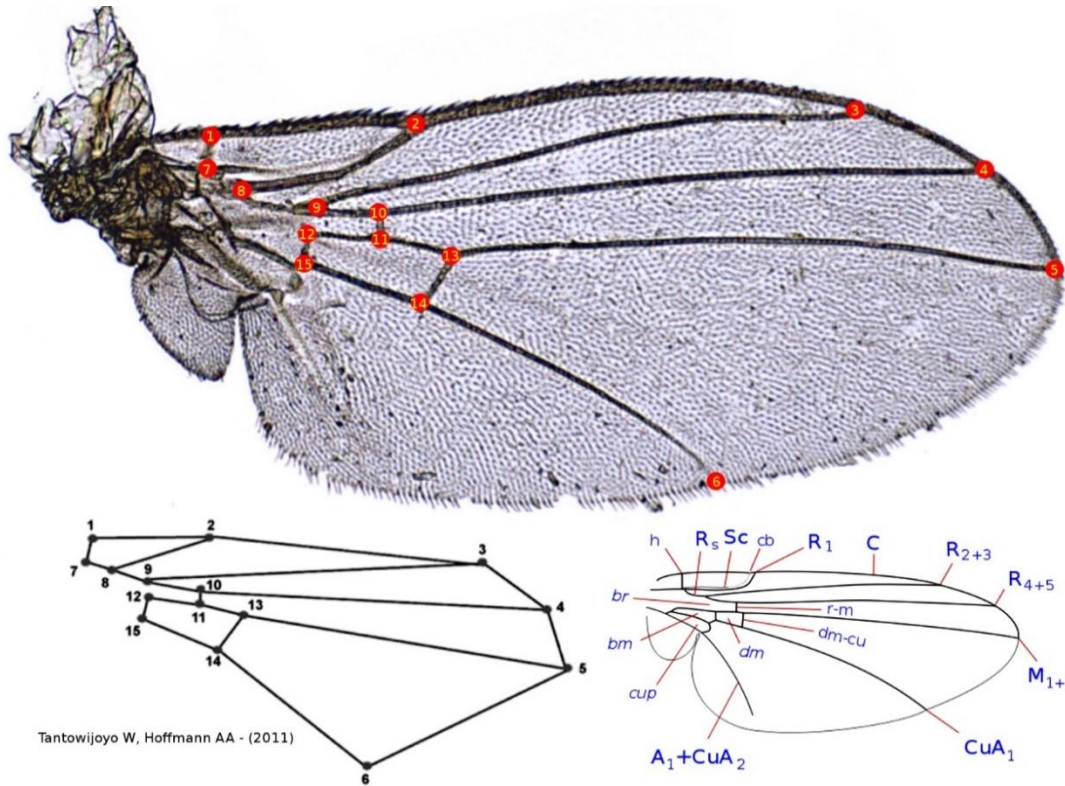


Figura 4. A - Vista dorsal da asa direita de *Liriomyza sativae* com a posição dos 15 marcos anatômicos. B - Representação gráfica do consenso e eixos alares formados pelos 15 marcos anatômicos por linhas para facilitar a visualização. C - Os pontos representam os marcos e a numeração corresponde a ordem de ingresso destes. Foto: Sombra, K.D.S. 2016.

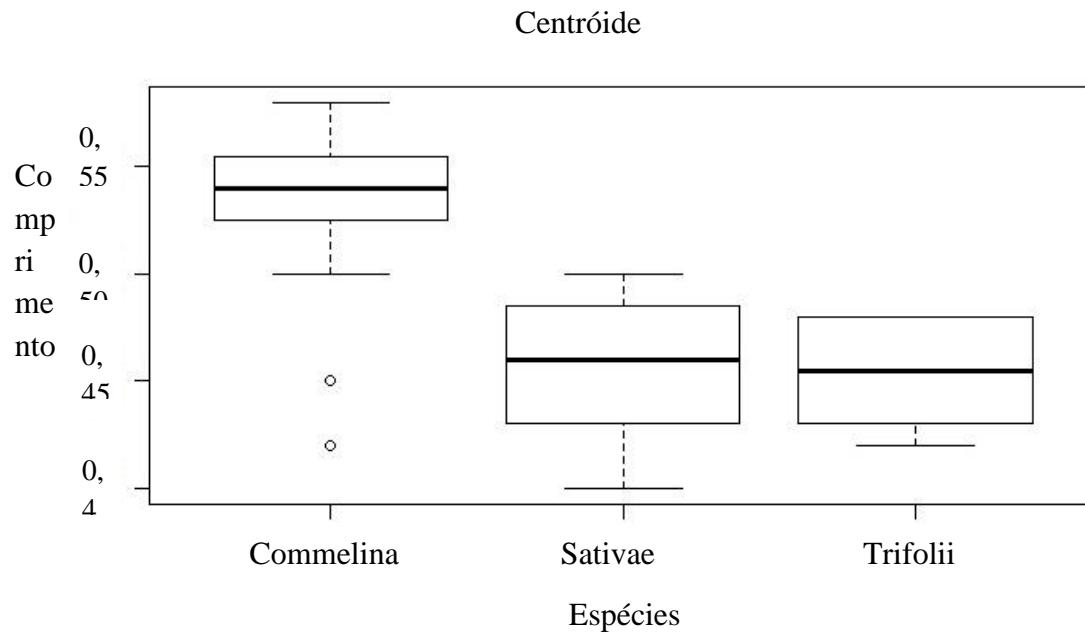


Figura 5. Gráficos de variação de tamanhos de centroide das espécies *Liriomyza sativae*, *Liriomyza trifolii* e *Liriomyza commelinae*. Nota-se que os tamanhos de centroide de *Liriomyza commelinae* possuem valores superiores aos de *Liriomyza sativae* e *Liriomyza trifolii*

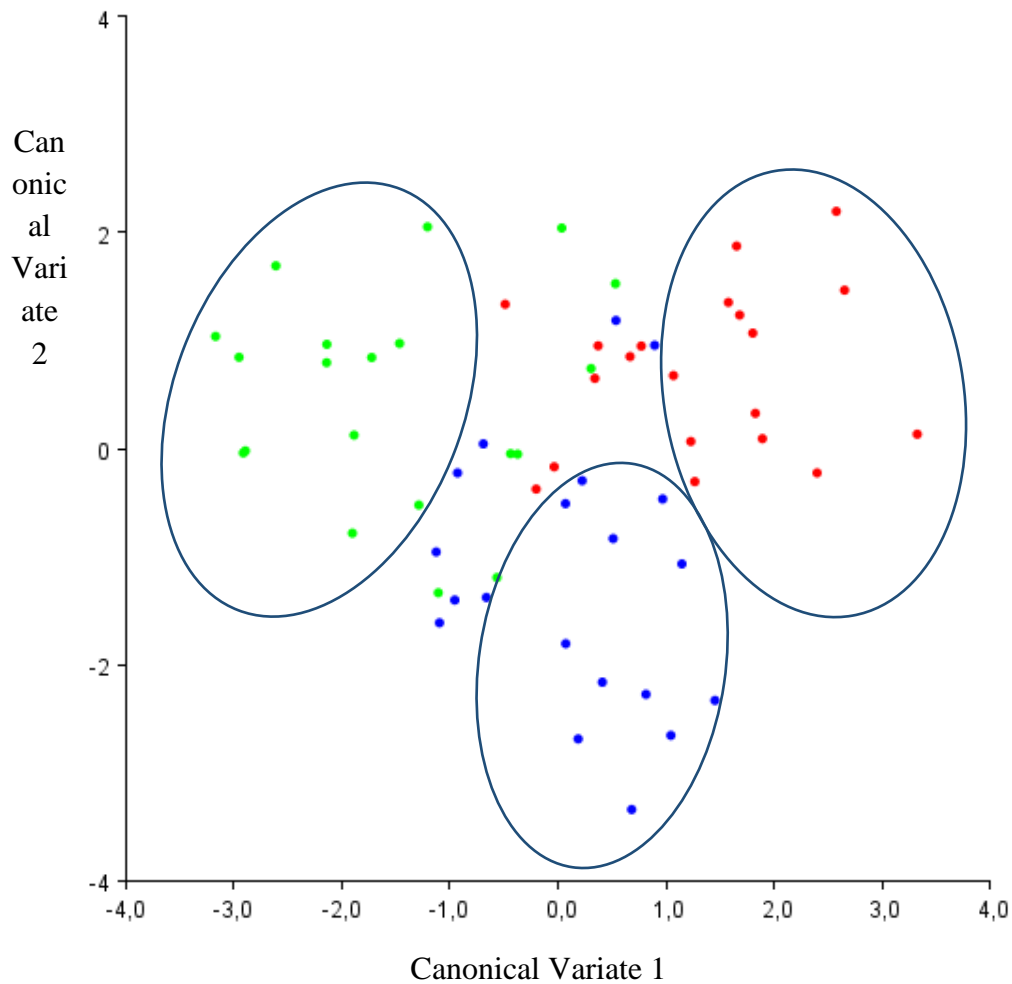


Figura 6. Diagrama de dispersão em relação à CV1 e CV2 das resultantes da comparação entre as asas das fêmeas das espécies *Liriomyza sativae*, *Liriomyza trifolii* e *Liriomyza commelinae*. *Liriomyza sativae* está representado pelos pontos verde, *Liriomyza trifolii* pelos pontos azuis, *Liriomyza commelinae* pelos pontos vermelhos. Notar que há a diferenciação parcial entre os três grupos:

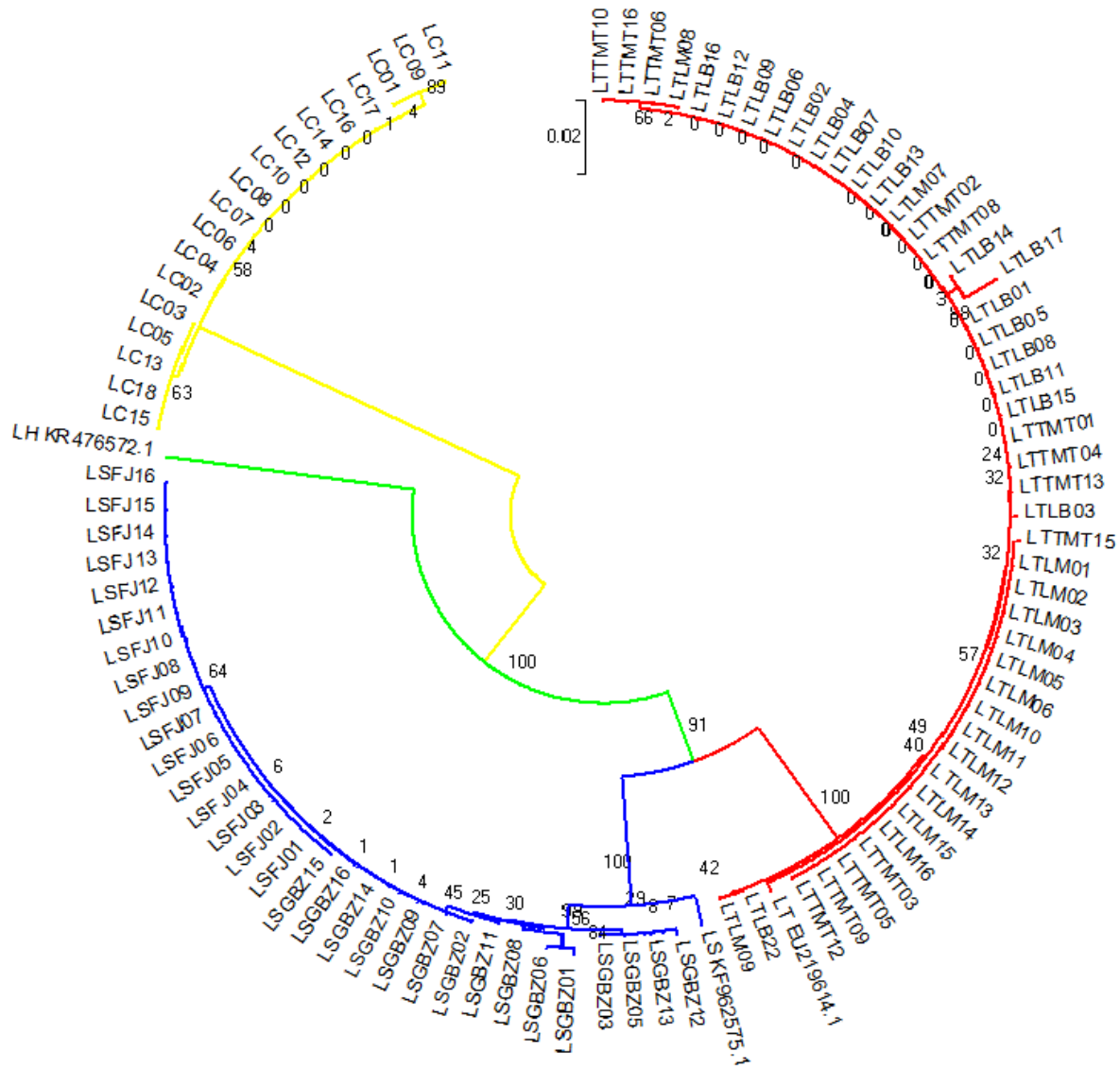


Figura 7. Arvore filogenética obtida por análise de Neighbor-Joining, utilizando a metodologia de Kimura 2 Parâmetros, com sequência nucleotídicas do gene mitocondrial COI. Os valores dos ramos correspondem ao suporte por bootstrap (1000 replicações).

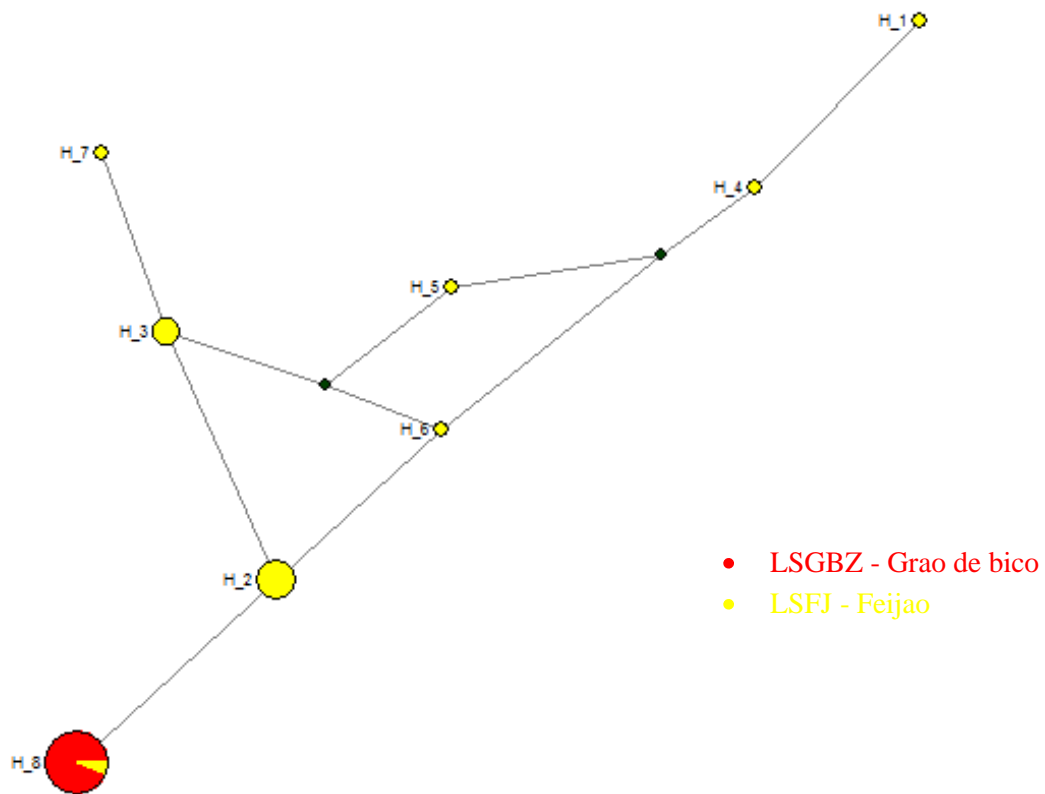


Figura 8. Frequência de Haplotipos encontrados nas 2 populações de *Liriomyza sativae*.

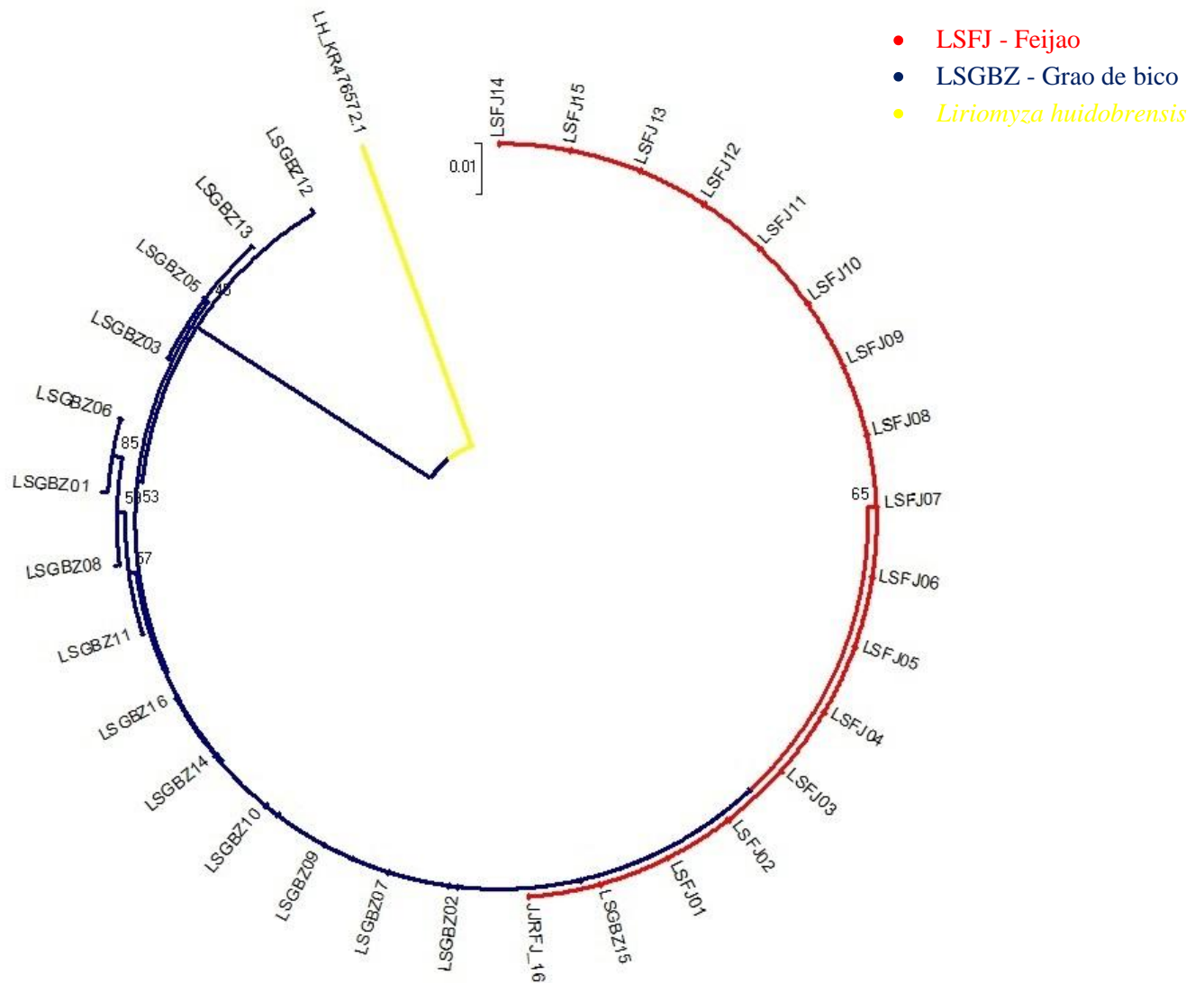


Figura 9. Arvore filogenética das populações de *Liriomyza sativae* obtida por análise de Neighbor-Joining, utilizando a metodologia de Kimura 2 Parâmetros, com sequência nucleotídica do gene mitocondrial COI. Os valores dos ramos correspondem ao suporte por bootstrap (1000 replicações).

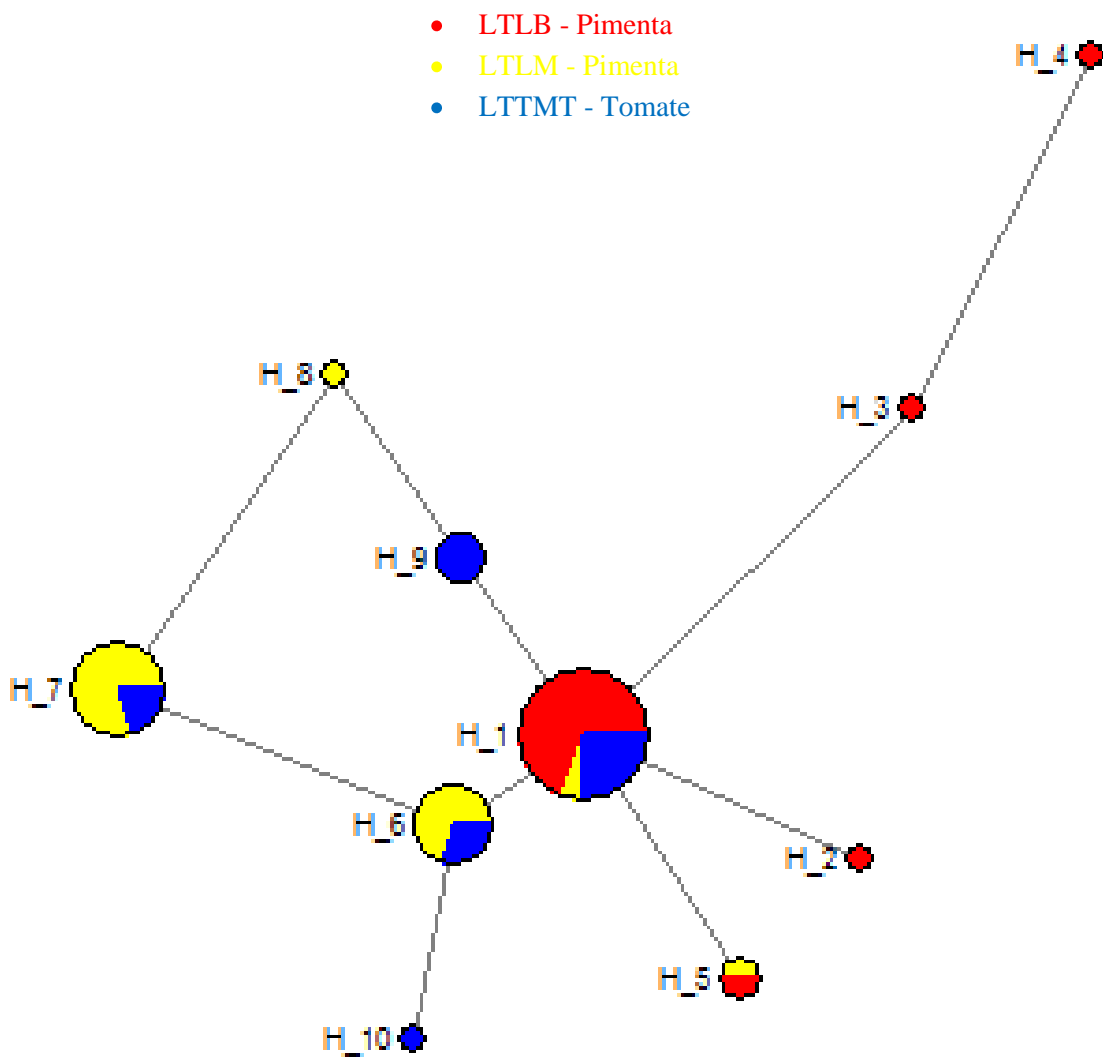


Figura 10. Frequência de Haplótipos encontrados nas 3 populações de *Liriomyza trifolii*.

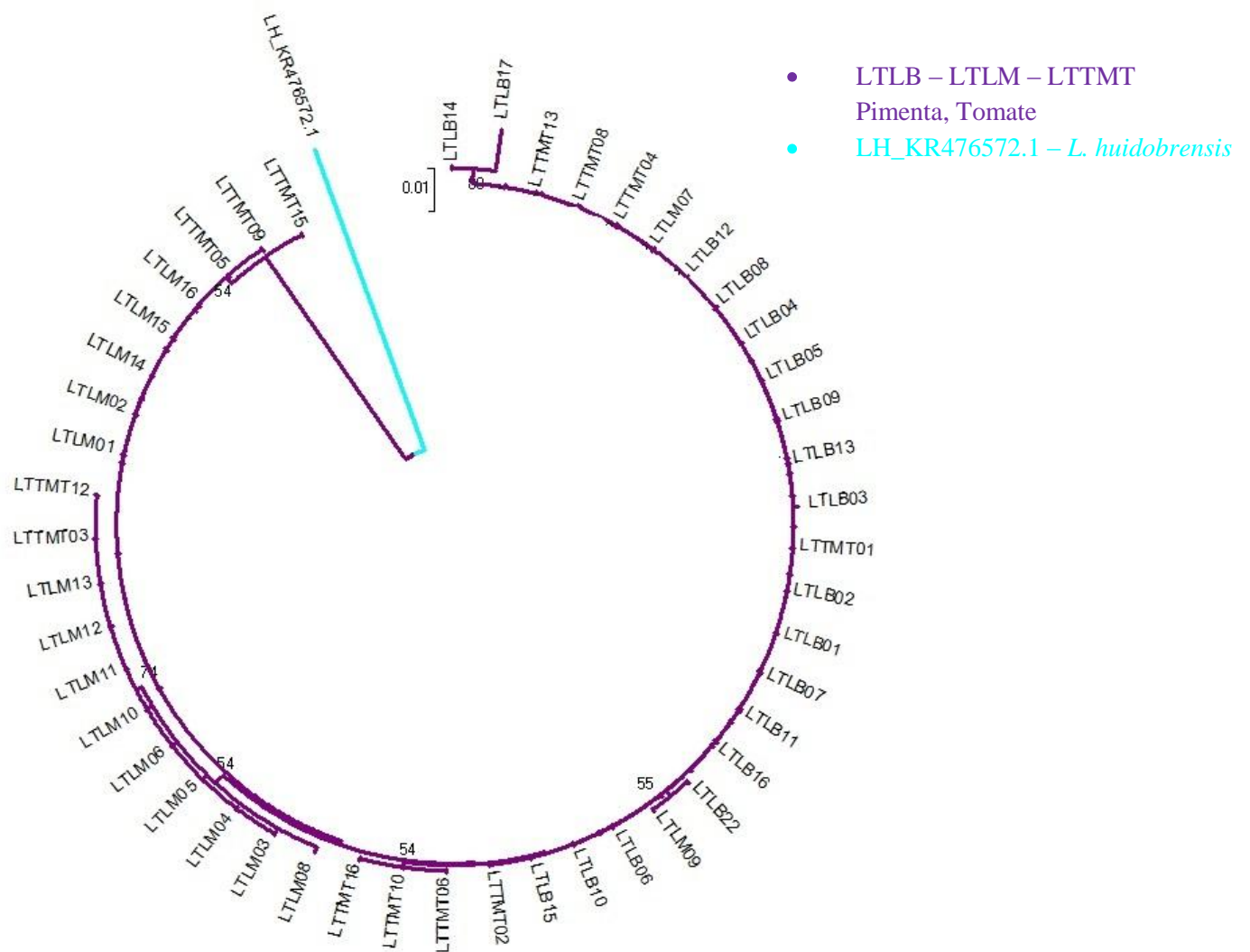


Figura 11. Arvore filogenética das populações de *Liriomyza trifolii* obtida por análise de Neighbor-Joining, utilizando a metodologia de Kimura 2 Parâmetros, com sequência nucleotídica do gene mitocondrial COI. Os valores dos ramos correspondem ao suporte por bootstrap (1000 replicações).

CAPITULO 3

ESTRUTURA GENETICA DE POPULAÇÕES ALOPÁTRICAS DE *Liriomyza sativae* (BLANCHARD) (DIPTERA: AGROMYZIDAE) DO BRASIL E MÉXICO.

KARLA D.S. SOMBRA¹, MOISES T.S. FREITAS², ELAINE C.B. FERREIRA¹, HERBERT Á.A. SIQUEIRA¹,
ELTON L. ARAUJO³ & VALDIR Q. BALBINO²

¹ Departamento de Agronomia – Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil.

² Departamento de Genética - Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50732-970 Recife, PE,- Brasil.

³ Departamento de Ciências Vegetais - Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA) - Km 47, BR 110, 59625-900 Mossoró, RN, Brasil.

¹Sombra, K.D.S., M.T.S. Freitas, E.C.B. Ferreira, H.A.A. Siqueira, E.L. Araujo & V.Q. Balbino. Genetic structure of allopathic populations of *Liriomyza sativae* (Blanchard) (Diptera: Agromyzidae) of Brazil and Mexico. A ser submetido.

RESUMO – Este estudo teve como objetivo comparar os padrões de diferenciação genética entre populações alopátricas de *Liriomyza sativae* distribuídas no Brasil e no México através da análise de polimorfismos do gene mitocondrial da Citocromo Oxidase I (COI), correspondente à região do DNA barcode. Foram coletados 137 espécimes de *L. sativae* no estado de Sinaloa/México e em sete estados brasileiros para explorar sua estrutura genética populacional. Os valores de identidade variaram de 97% a 99%, confirmando que as todas as populações avaliadas pertencem às espécies *L. sativae*. Encontramos níveis elevados de diversidade genética e estruturação populacional ($F_{ST} < 0,15$) em *L. sativae*. Os índices de divergência interpopulacional foram altos quando comparadas as amostras brasileiras e mexicanas, as análises de estruturação genética indicaram que as populações estudadas são divididas em dois grupos. A análise filogenética indicou a presença de dois clados de *L. sativae* separando as populações do Brasil e México.

PALAVRAS-CHAVE: Mosca minadora, fluxo gênico, espécies crípticas

GENETIC STRUCTURE OF ALLOPATRIC POPULATIONS OF POPULATION OF *Liriomyza sativae* (BLANCHARD) (DIPTERA: AGROMYZIDAE) OF BRAZIL AND MEXICO

ABSTRACT – The objective of this study was to compare the patterns of genetic differentiation among allopatric populations of *Liriomyza sativae* Blanchard *sativae* distributed in Brazil and Mexico through the analysis of polymorphisms of the mitochondrial Cytochrome Oxidase I (COI) gene, corresponding to the DNA barcode region. A total of 137 specimens of *L. sativae* were collected in the state of Sinaloa / Mexico and seven Brazilian states to explore their population genetic structure. The identity values ranged from 97% to 99%, confirming that all the populations evaluated belong to *L. sativae* species. We found high levels of genetic diversity and population structure ($F_{ST} < 0.15$) in *L. sativae*. The indices of interpopulation divergence were high when compared to the Brazilian and Mexican samples. The analysis of genetic structuring indicated that the populations studied are divided into two groups. Phylogenetic analysis indicated the presence of two clades of *L. sativae*, separating populations from Brazil and Mexico.

KEY WORDS: Leafminer, genus flow, cryptic species

Introdução

As moscas minadora do gênero *Liriomyza* são insetos da ordem Diptera, família Agromyzidae, subfamília Phytomyzinae (Spencer & Steyskal 1986)). Este gênero apresenta mais de 300 espécies distribuídas pelo mundo todo, ocorrendo em maior abundância nas regiões temperadas. Deste total, 23 espécies possuem destaque por ocasionar danos econômicos a plantas de importância agrícola e ornamental (Parrella 1987, Murphy & LaSalle 1999). Cinco dessas espécies são consideradas polífagas, o que é uma característica incomum na família dos agromizídeos (Rauf *et al.* 2000, Shepard *et al.* 1998).

A taxonomia dos agromizídeos tornou-se bastante confusa no passado, devido à grande semelhança morfológica, além de possuírem várias espécies hospedeiras em comum (Parrella 1982). Com o número limitado de características morfológicas confiáveis empregadas na discriminação de espécies de *Liriomyza*, as análises moleculares passam a ser uma ferramenta alternativa para a diferenciação taxonômica, permitindo a definição de uma estratégia eficaz para realizar amplos estudos de divergência a nível intraespecífico e interespecífico, independentemente do estágio de vida da praga (Behere *et al.* 2007).

Estas espécies de minadores se estabeleceram em áreas agrícolas e ornamentais de todo o mundo, causando sérios prejuízos a um amplo número de espécies vegetais economicamente importantes (Spencer, 1973). Acredita-se que a disseminação das espécies de *Liriomyza* para novas áreas geográficas ocorreu através da comercialização de hortaliças (Reitz *et al.* 2013).

Estudos anteriores sobre a biologia de *Liriomyza sativae* relataram uma elevada variação que pode ser explicada em análises sobre a variação genética dessa espécie de mosca minadora (Zhang *et al.* 2000, Tokumaru 2003, Haghani *et al.* 2007). Estudos biológicos com diferentes populações de *L. sativae* têm se mostrado de extrema relevância, dando fortes indícios da

existência de um complexo de espécies formado por um número ainda desconhecido de espécies crípticas (Scheffer & Lewis, 2005, Ferreira 2014).

O DNA barcode corresponde a um segmento do gene que codificam a subunidade I da Citocromo Oxidase (mtCOI), sendo este gene empregado como sistema universal de marcador molecular para a delimitação taxonômica de uma grande variedade de espécies de insetos (Simon et al. 1994), incluindo os gêneros pertencentes à ordem Diptera, para o qual uma base de dados de sequência está disponível (Behere *et al.* 2007, 2008, Li *et al.* 2011, Tay *et al.* 2013).

Este estudo teve como objetivo comparar os padrões de diferenciação genética entre populações alopátricas de *L. sativae* distribuídas no Brasil e no México através do DNA barcode, já que essas populações são separadas geograficamente, possivelmente não possuem fluxo gênico e fazem parte um complexo de espécies crípticas.

Material e Métodos

Coleta de Campo de *Liriomyza sativae*. As amostras foram coletadas em várias espécies hospedeiras, em populações de diferentes estados do Brasil e do México (Tabela 1). Exemplos adultos foram conservados em etanol 95% e mantidos a -20 ° C. Todas as amostras de campo foram morfológicamente identificadas durante a análise genética.

Extração de DNA, PCR e Sequenciamento. O DNA genômico das amostras de *L. sativae* foi extraído utilizando Chelex[®]100 (BioRad, Berkeley, California, USA), seguindo a metodologia descrita por Costa-Junior *et al.* 2015. Um fragmento de aproximadamente 700 pb do Citocromo Oxidase I (COX I) foi amplificado por PCR utilizando os iniciadores de DNA barcode HCO2198-L (5'- TAAACTTCWGGRTGWCCAAARAATCA-3') e LCO1490-L (5' GGTCWACWAATCATAAAGATATTGG-3'), descrito por Herbert *et al.* (2003). Reações de amplificação foram realizadas utilizando o kit Mix Go Taq Colorless, de acordo com as

especificações do fabricante (Promega® Fitchburg, Wisconsin, USA). Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% e submetidos a eletroforese para separação e visualização dos fragmentos. Os amplicons foram purificados utilizando o Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System kit (Promega® Fitchburg, Wisconsin, USA).

O sequenciamento foi realizado em um sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems, Cleveland, Ohio, EUA). Apenas sequências com valor de Phred (Ewing *et al.* 1998) superior a 30 foram utilizados na análise. Montagem de contigs foi realizada utilizando CodonCode Aligner (CodonCode Corporation). Alinhamentos foram feitos utilizando BLAST (Altschul 1990). Todas as novas sequências produzidas neste estudo serão depositadas no GenBank.

Análises Filogenéticas. O alinhamento das sequências do COI (mtDNA) foi conduzido pelo programa de alinhamento múltiplo Muscle (Edgar 2004) incorporado no MEGA v. 6.0 (Tamura *et al.* 2011). As sequências obtidas para cada população foram comparadas com sequências disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (GenBank), através do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Para a construção da árvore filogenética Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987), utilizou-se a correção Kimura 2 Parâmetros que também é incorporado no MEGA v. 6.0 (Tamura *et al.* 2011). A consistência do ramo foi avaliada usando 1000 repetições de bootstrap. Sequências de *Liriomyza sativae* (KF962593), *L. huidobrensis* (EF104703), *L. trifolii* (GU327644) foram utilizadas como grupo externo.

Diversidade Genética. A diversidade genética intra-populacional foi mensurada através da análise de diversidade haplotípica e nucleotídica, número de sítios polimórficos e número de transições e transversões, utilizando-se os programas DnaSP 5.0 (Rozas *et al.* 2003) e o Network 4.6 (www.fluxus-engineering.com). Realizou-se o teste de neutralidade D de Tajima que se baseia

na distribuição das frequências de mutação e na distribuição de haplótipos, distinguindo as diferenças entre as sequências de DNA evoluindo aleatoriamente (neutra) e daquelas que evoluem no âmbito de um processo não aleatório.

Foram feitas análises quanto ao nível de diferenciação genética com base no índice de fixação F_{ST} de forma pareada entre as populações usando o software DnaSP 5.0 (Rozas *et al.* 2003). O número médio de substituições por sítios entre as populações (D_{xy}), o número total de substituições por sítios entre as populações (D_a), número de polimorfismos compartilhados entre as populações pareadas (S_s) e o número de diferenças fixadas entre as populações pareadas (S_f) foram calculados no software DnaSP 5.0 (Rozas *et al.* 2003).

Resultados

Para o fragmento do gene COI foram obtidas 106 sequências, representando as populações coletadas no Ceará, Pernambuco, Bahia, Rio Grande do Norte e Espírito Santo. O sequenciamento da região COI foi obtido para 31 sequências de *L. sativae* coletados em três estados do México. Observaram-se valores de identidade entre 97% a 98% de *L. sativae* (Número de acesso: KF962593) nos exemplares brasileiros e 99% nos exemplares mexicanos.

As análises intrapopulacionais das populações brasileiras de *L. sativae* resultaram na detecção de 15 sítios variáveis, distribuídas entre oito sítios informativos de parcimônia e sete singletons, representando, respectivamente, 1,1% e 0,9% do total de sítios observados. Os exemplares mexicanos de *L. sativae* apresentaram sete sítios variáveis distribuídos entre cinco sítios informativos de parcimônia e dois singletons.

A análise intrapopulacional das populações de *L. sativae* mexicanas mostraram um maior nível de diferenciação genética em relação às populações brasileiras. Na análise interpopulacional foi possível observar um alto valor de divergência genética, estimado a partir do índice de fixação

haplotípica ($F_{ST} = 0.96194$), mostrando ser bastante significativo ao comparar as populações advindas do Brasil e México (Tabela 2).

As populações pertencentes aos estados brasileiros apresentaram um baixo valor de diversidade nucleotídica e haplotípica, quando comparados aos indivíduos das populações mexicanas (Tabela 1). O teste D de Tajima foi negativo e significativo ($P < 0.05$) para todas as populações estudadas, o que sugere uma expansão populacional recente e é indicativo de baixa frequência de mutações, de acordo com o esperado sob o modelo de neutralidade, tamanho populacional constante, perda de subdivisão e fluxo gênico.

Foi número elevado de diferenças dos nucleotídeos (K_{xy}), índice de fixação haplotípica (F_{ST}), número médio de substituição de nucleotídeos por sítio (D_{xy}) e número de substituições por sítios entre as populações (D_a) (Tabela 2). Os valores de D_a e D_{xy} foram bastante elevados, similarmente ao que ocorreu com o valor do F_{ST} , refletindo no nível de divergência genética existente entre os dois clados.

Constatou-se a presença de dois clados distintos para *L. sativae* nas populações do Brasil e México, dando indícios que as populações brasileiras têm a sua ancestralidade ligada aos indivíduos do México, devido ao nível de associação genética observado entre as populações (Fig. 1). O primeiro clado foi composto na sua totalidade por exemplares pertencentes às populações dos sete estados brasileiros, enquanto o segundo clado tem em sua composição indivíduos pertencentes às populações do México. Através desta análise foi possível verificar a existência de sítios informativos de parcimônia (Fig. 2), que ajudam a compreender um pouco mais sobre a estruturação genética e as relações filogenéticas entre as populações, devido a existência de sítios polimórficos distintos entre as populações do Brasil e México.

Discussão

A caracterização morfológica dos adultos e larvas é difícil do gênero *Liriomyza*, uma vez que estes insetos são diminutos e possuem coloração semelhante, difícil de ser realizada a olho nu. Dessa forma, para a identificação precisa da espécie é necessário recorrer a taxonomistas que, em laboratório, efetuam a dissecação e o exame da genitália do macho (Gimaraes *et al.* 2009).

Outra forma de identificar as espécies é por meio da biologia molecular, utilizando marcadores moleculares como ferramentas complementares em abordagens integrativas para identificação de muitas espécies de insetos, principalmente na identificação de espécies crípticas (Hebert *et al.* 2003, 2004). Vários trabalhos têm sido realizados utilizando a identificação molecular em diferentes espécies de insetos de importância econômica, como as espécies do gênero *Liriomyza* por exemplo (Scheffer & Lewis 2001, Scheffer *et al.* 2006, Liping *et al.* 2008).

As análises filogenéticas constataram a presença de dois clados distintos em *L. sativae* através do valor de $F_{ST} = 0.96194$, sendo dispostos da seguinte forma: Brasil (Clado I) e México (Clado II). Ferreira *et al.* (2014) avaliaram amostras de *L. sativae* de diferentes estados brasileiros, relatando um valor de F_{ST} que variou de 0,00 a 0,09, mostrando a existência de um único clado, similarmente ao observado neste estudo com as populações brasileiras. Isto pode ser atribuído ao fato das amostras do Brasil terem sofrido provavelmente um processo de especiação recente.

Scheffer *et al.* (2006) obtiveram resultados semelhantes ao encontrado nesta pesquisa, quando analisaram populações de *L. sativae* e *L. trifolii* distribuídas nas Filipinas utilizando o DNA barcode, relatando a presença de três clados distintos para a mesma espécie em estudo, demonstrando assim a eficiência deste marcador molecular na caracterização das espécies que compõem o gênero *Liriomyza*.

Escassos são os estudos sobre espécies de *Liriomyza* relacionados à genética de populações em países como o Brasil e o México para este complexo de espécies, sendo necessário

uma ampliação das populações estudadas. Lima *et al.* (2009), realizaram um dos primeiros estudos de identificação molecular para espécies de *Liriomyza* no Brasil, ao analisar populações de Mossoró, Rio Grande do Norte, sendo estas identificadas como *L. sativae*, resultado este confirmado em nosso estudo.

Vários são os fatores hegemônicos para a especiação de vários grupos de insetos, tais como separação geográfica ou reprodutiva, dando origem a espécies diferentes (Haffer 2001). Pesquisas relatam uma forte limitação do DNA Barcode quando utilizado em conjunto com métodos de distância genética, principalmente quando se trata de definir fronteiras entre espécies que se sobrepõem elevadamente (Witt *et al.* 2006). As taxas de evolução variam intra e interespecificamente em diferentes espécies (Rubinoff 2006, Rubbinoff *et al.* 2006).

Os testes D de Tajima forneceram valores negativos em todas as populações avaliadas, indicando a possível existência de excesso de mutações raras, que pode implicar também na expansão recente demonstrada através do índice de diversidade genética (Ruiz-Pesini *et al.* 2004).

A análise de divergência genética obteve elevado valor significativo entre as populações brasileiras e mexicanas de *L. sativae* utilizando o índice de fixação genética (F_{ST}) para avaliar a diferenciação genética destas populações, requerendo uma provável relação hospedeiro-praga, como citado em outros trabalhos (Pang *et al.* 2005, Liping *et al.* 2008).

A variação genética reduzida é encontrada em populações introduzidas que tendem a passar durante o período de adaptação no novo ambiente. Relatos recentes sobre insetos praga (Puillandre *et al.* 2008, Ahern *et al.* 2009) demonstram que a redução da diversidade genética é comum em espécies invasoras, mas não é um fator limitante para o sucesso de identificação destas espécies.

Diversos autores observaram uma redução significativa na oscilação genética deste gênero em novos habitats, sendo este padrão associado ao efeito fundador, o qual pode influenciar na

sobrevivência, como também causar alterações nos traços fenotípicos e no potencial adaptativo (Baliraine *et al.* 2004, Puillandre *et al.* 2008, Ahern *et al.* 2009, Tooman 2011).

O status taxonômico de uma espécie de importância econômica é essencial para que seu correto manejo seja realizado, nosso estudo mostrou a relevância do uso do DNA barcode como uma ferramenta integrativa bastante eficiente na identificação molecular das populações de *L. sativae*, ampliando mundialmente o conhecimento sobre esta espécie.

Literatura citada

- Ahern, R.G., D.J. Hawthorne & M.J. Raupp. 2009.** Founder effects and phenotypic variation in *Adelges cooleyi*, an insect pest introduced to the eastern United States. *Biol. Inv.* 11: 951–971.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers & D.J. Lipman. 1990.** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-10.
- Baliraine, F.N., Bonizzoni, M. & Guglielmino, C.R. 2004.** Population genetics of the potentially invasive African fruit fly species, *Ceratitis rosa* and *C. fasciventris* (Diptera: Tephritidae). *Mol. Ecol.* 13: 683–695.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C. & P. Green. 1998.** Base-calling of automated sequencer traces using Phred. *Genome Res.* 8: 175-185.
- Ferreira, E.C.B.F. 2014.** Estrutura genética de populações naturais de *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae). Dissertação de Mestrado, UFRPE, RECIFE. 78p.
- Haffer, J. 2001.** Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia, p. 451-18. In I.C.G. Vieira; J.M.C. DA Silva; D.C. Oren & M.A. D’Incao (Eds.), *Diversidade cultural e biológica da Amazônia*. Belém, Museu Paraense Emílio Goeldi, 421p.
- Haghani, M., Y. Fathipour, A.A. Talebi & V. Baniameri. 2007.** Thermal requirement and development of *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) on cucumber. *J. Econ. Entomol.* 100: 350-356.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball & J.R. Dewaard. 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 270: 313-321.
- Hebert, P.D.N., M.Y. Stoeckle, T.S. Zemplak & C.M. Francis. 2004.** Identification of birds through DNA barcodes. *Plos Biol.* 2: 1657-1663.

- Lima, T.C.C., L.D. Geremias & J.R.P Parra. 2009.** Efeito da temperatura e umidade relativa do ar no desenvolvimento de *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) em *Vigna unguiculata*. Neotrop. Entomol. 38: 727- 733.
- Li-ping, W., Yu-zhou, D., Ya-ting, H., Fu-shan, Z. & L. Zi-qiang. 2008.** Genetic variation of host populations of *Liriomyza sativae* Blanchard. Agric. Sci. China 7: 585-590.
- Murphy, S.T. & J. Lasalle. 1999.** Review article: balancing biological control strategies in the IPM of new world invasive *Liriomyza* leafminers in field vegetable crops. Bioc. News Inf. 20: 91-104.
- Pang, B.P., Cheng, J.A., Huang, E.Y. & Z.S. Bao. 2005.** Effects of different host plants on population parameters of *Liriomyza sativae*. Pl. Prot.31: 26-28.
- Parrella, M.P. 1982.** A review of the history and taxonomy of economically important serpentine leafminers (*Liriomyza* spp.) in California (Diptera: Agromyzidae). Pan- Pacif. Entomol. 58: 302-308.
- Parrella, M. P. 1987** Biology of *Liriomyza*. Annu. Rev. Entomol. 32: 201–224.
- Puillandre, N., Dupas, S.O., Dangles, J.L., Zeddou, C., Apdevielle-Dulac, K., Barbin, M., Leguizamon, M.T. & J.F. Silvain. 2008.** Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. Biol. Inv. 10: 319 - 333.
- Rauf, A., Shepard, B. M. & M.W. Johnson. 2000.** Leafminers in vegetables, ornamental plants and weeds in Indonesia: surveys of host crops, species composition and parasitoids. Int. J. Pest Manage. 46: 257–66.
- Reitz, S.R., Gao, Y. & Z. Lei. 2013.** Insecticide Use and the Ecology of Invasive *Liriomyza* Leafminer Management. Disponível em <<http://www.intechopen.com/download/get/type/pdfs/id/42154>> Acesso em: 18 Agos. 2016.
- Rubinoff, D. 2006.** Utility of mitochondrial DNA barcode in species conservation. Conserv. Biol 20:1026–1033.
- Rubinoff, D., Cameron, S. & K. Will. 2006.** A genomic perspective on the shortcoming mitochondrial DNA for “barcoding identification”, J. Hered 97:581–594.
- Ruiz-Pesini, E., Mishmar, D., Brandon, M., Procaccio, V. & D.C.Wallace. 2004.** Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. Science 303: 223-226.
- Saitou, N., Nei, M. 1987.** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 406-425.

- Scheffer, S.J. & M.L. Lewis. 2001.** Two nuclear genes confirm mitochondrial evidence of cryptic species within *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94: 648-653.
- Scheffer, S.J. & M.L. Lewis. 2005.** Mitochondrial phylogeography of vegetable pest *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae): divergent clades and invasive populations. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98: 181-186.
- Scheffer, S.J., Lewis, M.L. & R.C. Joshi. 2006.** DNA barcoding applied to invasive leafminers (Diptera: Agromyzidae) in the Philippines. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 99: 204-210.
- Shepard, B.M. & A.R. Samsudin. 1998.** Seasonal incidence of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) and its parasitoids on vegetables in Indonesia. *Int. J. Pest Manage.* 44: 43-47.
- Spencer, K.A. 1973.** Agromyzidae (Diptera) of economic importance. *Series Entomologica.* Netherlands. 418p
- Spencer, K.A. 1976.** The agromyzidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna ent. scand. Denmark.* 305-606.
- Spencer, K. A. & J. C. Steyskal. 1986.** Manual of the Agromyzidae (Diptera) of the united states. U.S. Department of Agriculture. Washington. D. C. Agric. Handb. 638p.
- Rozas, J., J.C. Sánchez-DelBarrio, Messeguer, X. & R. Rozas. 2003.** DnaSP, DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., N. & S. Kumar. 2007.** MEGA4.0: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar. 2011.** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- Tooman, L.K., Rose, C.J., Carraher, C., Suckling, D.M., Paquette, S.R., Ledezma, L.A. & R.D. Newcomb. 2011.** Patterns of mitochondrial haplotype diversity in the invasive pest *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.* 104: 920-932.
- Tokumaru, S. 2003.** Effects of temperature and photoperiod on development and reproductive potential of *Liriomyza sativae*, *L. trifolii*, and *L. bryoniae* (Diptera: Agromyzidae). *J. Appl. Entomol. Zool.* 47: 143-52.
- Wang, S., Lei, Z., Wang, H., Dong, B. & B. Ren. 2011.** The complete mitochondrial genome of the leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). *Mol. Biol. Rep.* 38: 687-692.
- Witt, J.D.S., Threlloff, D.L. & P.D.N. Hebert. 2006.** DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. *Mol. Ecol.* 15: 3073-3082.

Zhang, R.J., D.J. Yu & C.Q. Zhou. 2000. Effect of temperature on certain population parameters of *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae). Entomol Sin. 7: 185-192.

Tabela 1. Testes de neutralidade e diversidade genética intra-populacional para cada amostra.

Amostras	Targima's D	N ¹	Hd ²	π ³	NS ⁴	H ⁵	K ⁶
BRASIL	-2.01653	106	0.38473	0.00096	12	11	0.53700
MEXICO	-0.49212	31	0.66882	0.00260	7	8	1.45800

¹N: Tamanho da amostra.

²HD: Diversidade de haplótipos.

³ π : Diversidade de nucleótidos.

⁴NS: Número de sítios polimórficos.

⁵H: Haplótipos.

⁶K: Número médio de diferença de nucleotídeos

Tabela 2. Diferenciação genética entre populações de *Liriomyza*.

Populações	Da ¹	Dxy ²	Kxy ³	F _{ST}	Ss ⁴	Sf ⁵
BRAZIL X MEXICO	0.04495	0.04673	26.21302	0.96194	1	22

¹Da: Número líquido de substituições por sítios entre as populações.

²Dxy: Número médios de substituições nucleotídicas por sítios entre os dois grupos.

³Kxy: Diferença média de nucleotídeos par a par entre dois grupos.

⁴Ss: Sítios compartilhados.

⁵Sf: Sítios fixados

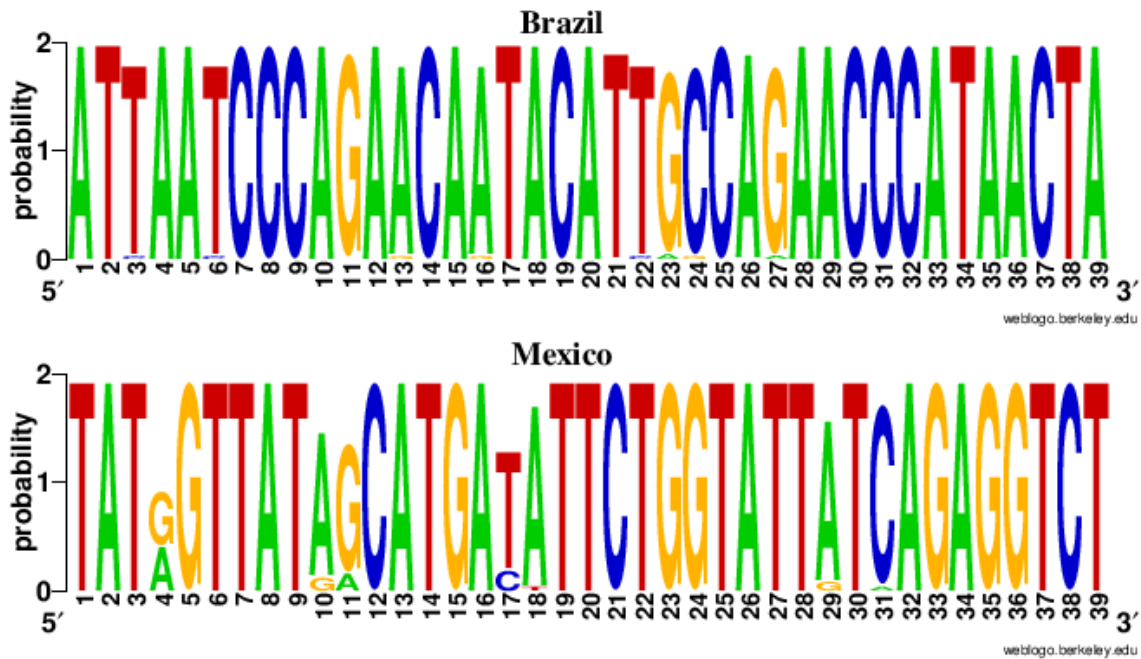


Figura 2. Representação esquemática dos sítios polimorfismo de um fragmento de 707 pb do gene COI usando Weblog. São mostradas as sequências obtidas de *Liriomyza sativae* coletados em Sinaloa/México nos estados do Ceara, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Bahia e Espírito Santo no Brasil. Tamanho da fonte é um indicativo da frequência da base em um determinado sítio.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados taxonômicos e genéticos das espécies do gênero *Liriomyza*, fornece uma grande contribuição no conhecimento desses insetos pragas, que são importantes na agricultura. Porém, pesquisas futuras com o uso de outros genes e/ou ferramentas associadas se faz necessário para se obter um maior conhecimento sobre a evolução dos insetos deste grupo.