



I SEAMA

**I Seminário de Entomologia e
Acarologia Agrícola na Amazônia**

(23 a 25 de novembro 2011)

Promoção:



Realização:



Apoio:



Ferramentas moleculares e seu uso na sistemática de insetos e ácaros de importância agrícola

Denise Navia¹ | Renata Santos de Mendonça^{1,2}

Ferramentas moleculares vêm sendo cada dia mais utilizadas em Entomologia e Acarologia, principalmente em estudos de sistemática e biologia de populações, e têm contribuído significativamente para aclarar algumas questões difíceis de serem respondidas há alguns anos atrás. A sistemática molecular tem sido de grande interesse para praticamente todos os grupos de organismos. A facilidade de amplificar numerosas cópias de um gene ou região genômica de interesse abre inúmeras possibilidades, não apenas para a identificação de organismos, mas também para testar hipóteses filogenéticas.

A acurada identificação de espécies ou categorias sub-específicas não é importante apenas para a compreensão de aspectos ecológicos e evolutivos dos organismos. A errônea ou incompleta identificação de espécies de importância econômica pode ter sérias implicações negativas. No caso de pragas agrícolas e seus inimigos naturais, falhas na identificação podem levar à aplicação inadequada de medidas de prevenção e controle (Paterson 1991, Clarke & Walter 1995, Armstrong & Ball 2005). Dados moleculares podem ser extremamente úteis para a identificação de espécies de pragas e inimigos naturais morfologicamente muito próximos e/ou que constituem espécies crípticas. A identificação detalhada e o conhecimento da variabilidade intraespecífica de um agente de controle biológico é a base para o estabelecimento de estratégias eficientes de controle biológico. Esta variabilidade também é relevante em se tratando de vetores de fitopatógenos, especialmente quando o manejo do patossistema deve ser baseado na resistência genética do hospedeiro ao vetor. Biótipos de um vetor podem apresentar níveis diferentes de resistência aos genes da planta hospedeira envolvidos na resistência. A interceptação de pragas em pontos de

¹ Estação Quarentenária de Germoplasma Vegetal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação biológica, final W5 Norte, Cx. Postal 02372, 70.770-900, Brasília, DF (navia@cenargen.embrapa.br)

² CNPq bolsista de pós-doutorado.

entrada em um país depende de uma minuciosa inspeção de todo material vegetal importado e de uma precisa identificação dos organismos detectados. Os marcadores moleculares podem possibilitar a identificação específica de pragas interceptadas quando o estudo morfológico do espécime e/ou dos estágios de desenvolvimento detectados não o permite. Desta forma, observa-se que a precisa identificação de insetos e ácaros de importância agrícola através de métodos moleculares pode beneficiar as mais diversas áreas, como controle biológico e químico, manejo cultural, resistência de plantas e resistência a pesticidas, defesa fitossanitária, etc.

Técnicas moleculares têm sido especialmente úteis para revelar a ocorrência de espécies crípticas. Os processos de especiação não são necessariamente acompanhados de diferenciação morfológica (Bickford *et al* 2007). A consequência disto é a existência de complexos de espécies que são linhagens geneticamente isoladas e morfológicamente indistinguíveis ou muito próximas, mas que podem diferir em características fisiológicas, comportamentais e/ou ecológicas (Pfenninger & Schwenk 2007, Calcagno *et al* 2010, Henry & Wells 2010). Em um conceito amplo duas ou mais espécies erroneamente classificadas e escondidas sob o nome de uma espécie podem ser consideradas espécies crípticas (Bickford *et al* 2007, Pfenninger & Schwenk 2007). A aplicação de técnicas moleculares durante as duas últimas décadas tem revelado diversidade críptica em quase todos os grupos taxonômicos (ver Hebert *et al* 2004, Bickford *et al* 2007) e estas espécies estão distribuídas entre todos os táxons de metazoários e em todas as regiões biogeográficas (Pfenninger & Schwenk 2007). É comum ocorrer que, após a revelação da ocorrência de espécies crípticas pela diversidade genética, este status seja confirmado através de detalhes morfológicos e/ou dados ecológicos (Bickford *et al* 2007).

O sério impacto econômico causado por pragas invasoras exóticas tem motivado a condução de pesquisas para a compreensão dos processos de invasão e ajudado a estabelecer estratégias de prevenção e controle, em particular o controle biológico clássico (ver Fagan *et al* 2002, Roderick & Navajas 2003, Facon *et al* 2008). Para isso é essencial o conhecimento da origem, fontes de introdução ou rotas de colonização de artrópodos invasores. Os marcadores moleculares têm sido utilizados para traçar rotas de invasão de pragas e para direcionar a prospecção de inimigos naturais na área de origem da praga (Bonizzoni *et al* 2001, Birungi & Munstermann 2002, Navia *et al* 2005, Darling & Blum 2007).

Obtendo informações sobre o DNA

Informações sobre o DNA de um organismo apresentam várias características importantes que as fazem especialmente úteis: 1) permitem acesso ao genótipo do organismo, ao invés do fenótipo; 2) dependendo da questão a ser esclarecida uma ou mais regiões do genoma podem ser estudadas levando-se em consideração a taxa evolutiva ou modo de herança; 3) podem ser obtidas a partir de qualquer estágio de desenvolvimento, de ambos os sexos e, em alguns casos, também de organismos já mortos; 4) podem ser obtidas a partir de pequenas quantidades de tecidos e o DNA é relativamente estável (Navajas & Roderick 2008).

Os principais avanços da genética molecular nas últimas décadas e que tem levado a um grande aumento do impacto das técnicas moleculares na biologia são: 1) o uso da *Polymerase Chain Reaction* (PCR) na qual fragmentos específicos de DNA são amplificados, permitindo a obtenção de concentrações elevadas do DNA do respectivo fragmento, que podem ser utilizadas em numerosas outras técnicas; 2) a utilização de conjuntos de *primers* iniciadores evolutivamente conservados e que podem ser utilizados para um amplo leque de organismos (Simon *et al* 1994); 3) possibilidade do seqüenciamento rotineiro de DNA, a um custo cada dia mais acessível (Navajas & Roderick 2008, Navajas & Navia 2010). Estas inovações aliadas com uma recente explosão no avanço das análises filogenéticas e de disponibilização de programas computacionais amigáveis para o estudo das seqüências de DNA (Excoffier & Heckel 2006, Gariepy *et al* 2007) têm tornado as técnicas moleculares ferramentas acessíveis a não especialistas.

Os dois métodos de análise de DNA utilizados em sistemática são: 1) comparação de seqüências de nucleotídeos de um locus específico, geralmente amplificado por PCR. A variação das seqüências é analisada diretamente utilizando-se métodos filogenéticos; 2) a variação das seqüências é acessada indiretamente, através da comparação de fragmentos de DNA homólogos, analisando-se a variação em número, tamanho ou conformação. Em um método chamado *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), um produto de PCR é gerado e, então, digerido com enzimas de restrição para a obtenção de um padrão específico de bandas que pode ser visualizado em gel. Desta forma, o que se faz é uma análise dos fragmentos gerados. Este segundo método apresenta menor resolução que o seqüenciamento de nucleotídeos, entretanto, pode ser uma alternativa interessante quando um elevado

número de indivíduos será avaliado ou quando extensos segmentos do genoma estão sendo estudados (Navajas & Roderick 2008).

Marcadores moleculares

Marcadores genéticos refletem diferenças em sequências de DNA e são utilizados como dados brutos para realizar estimativas de diversidade genética em todos os níveis taxonômicos, revelando informações sobre relações entre unidades taxonômicas as quais seriam dificilmente obtidas através de outras fontes (Ben-Ali *et al* 2000, Navajas & Fenton 2000, Behura 2006). A utilização de dados moleculares para a acurada diferenciação de espécies está agora bem consolidada (Caterino *et al* 2000, Tautz *et al* 2003). Além disso, para estudos populacionais os dados moleculares permitem realizar estimativa de fluxo gênico, identificação de haplótipos e linhagens, e predição de migração e históricos de colonização (Sunnucks 2000, Garant & Kruuk 2005, Navia *et al* 2005).

Os marcadores mais comumente utilizados em sistemática molecular de ácaros e insetos são o mtDNA e o rDNA. Estes marcadores apresentam diferenças consideráveis em sua organização genômica, processos de evolução e no modo de transmissão (Navajas & Roderick 2008).

As seqüências de DNA ribossomal (rDNA) são comumente utilizadas para o estudo das relações filogenéticas, da variabilidade genética, e de divergências dentro e entre espécies por apresentarem propriedades muito apropriadas para esta finalidade: taxas diferenciais de evolução entre diferentes regiões e genes repetidos (Weekers *et al* 2001). Nos organismos eucariontes, o rDNA apresenta unidades transcricionais repetitivas (tandem), as quais são separadas por espaços intergênicos. Dentro de cada unidade transcricional, o “*Internal Transcribed Spacer 1*” (ITS1) separa a pequena subunidade 18S da 5,8S, enquanto que o “*Internal Transcribed Spacer 2*” (ITS2) separa a unidade 5,8S da grande subunidade 28S. As regiões codantes apresentam pequena divergência entre espécies próximas, entretanto as regiões ITS podem apresentar maior variabilidade. Mutações ocorrem em taxas relativamente rápidas nestas regiões ITS (Weekers *et al* 2001). Assim, as regiões codantes e os espaçadores diferem largamente em sua taxa de evolução, de modo que estas regiões do rDNA apresentam potencial para revelar relações filogenéticas desde o nível de filo até o nível

populacional, sendo consideradas muito versáteis para análises filogenéticas (Hillis & Dixon 1991).

Seqüências de mtDNA representam uma ferramenta poderosa para estudos evolucionários e tem sido utilizadas em estudos de estrutura de populações, fluxo gênico, hibridização, biogeografia e relações filogenéticas (Avise *et al* 1987). A maior parte do mtDNA de animais superiores apresenta uma série de características que o torna marcadores ideais em estudos filogenéticos: 1) apresenta uma estrutura genética simples, sem a presença de regiões repetitivas, elementos transponíveis, pseudogenes ou introns; 2) geralmente evolui rapidamente, pois apresenta uma taxa de divergência de seqüências relativamente rápida. As variações se apresentam, primariamente, como substituições de bases; 3) a herança é maternal, o modo de transmissão ao longo das gerações é efetivamente haplóide, não há recombinação; seus genes representam um locus gênico; 4) a ordem e composição dos genes é conservada; 5) as seqüências são curtas em comparação às do genoma nuclear (Avise *et al* 1987, Hoy 1994, Roderick 1996). A taxa de evolução dos genes mitocondriais varia entre linhagens, entre genes e mesmo dentro dos genes. No mtDNA há regiões que divergem rapidamente, enquanto que outras regiões são altamente conservadas, podendo diferentes regiões serem utilizadas em diferentes níveis taxonômicos. De um modo geral, as variações no mtDNA em estudos populacionais parecem ser mais úteis que as variações nos genes ribossomais. Dentro de uma população, a frequência de um único haplótipo de mtDNA pode flutuar mais rapidamente que as frequências dos alelos de DNA nucleares e, por isto, o mtDNA seria mais sensível que o DNA nuclear ao “efeito fundador” e aos tamanhos reduzidos das populações invasoras. A perda ou aquisição de um haplótipo é importante em pequenas populações e a migração de poucos indivíduos entre populações seria suficiente para fixar uma linhagem de mtDNA nestas (Roderick 1996).

As filogenias não devem ser construídas utilizando-se um único marcador. É importante comparar os resultados de marcadores com propriedades distintas para um melhor entendimento das populações estudadas (Navajas & Boursot 2003). Estudos filogenéticos baseados em resultados de um único marcador molecular são frágeis e podem conduzir a conclusões infundadas ou resultados enganosos (Ross *et al* 1999, Navajas & Boursot 2003).

A escolha de marcadores genéticos com variabilidade adequada para a resolução das questões as quais se deseja investigar deve ser a etapa prévia a todos os

estudos de sistemática molecular. Os marcadores genéticos devem apresentar elevado polimorfismo e permitir a detecção de movimentos mínimos entre as populações. É necessário conhecer as propriedades gerais, os campos de aplicação e as limitações de cada marcador para se efetuar uma escolha compatível com os objetivos da pesquisa.

O código de barras do DNA (“DNA *barcoding*”) foi proposto como um método de diagnose molecular de espécies, tanto conhecidas como desconhecidas (Herbert *et al* 2003). Esta abordagem se refere à utilização de sequências de nucleotídeos, representando uma combinação única de bases, em regiões conservadas dos genes, as quais podem ser facilmente amplificadas através de PCR e seqüenciadas diretamente, para a identificação de espécies. Para a maioria dos animais, incluindo ácaros e insetos, a subunidade I do fragmento *citocromo oxidase* (*COI*) tem se tornado a região *barcoding* padrão. O código de barras do DNA foi proposto como uma solução para reduzir o impedimento taxonômico. Trata-se de uma abordagem polêmica e tem sido amplamente discutida (Tautz *et al* 2003, DeSalle *et al* 2005, Solé-Cava 2008).

Os marcadores mais amplamente utilizados em estudos de genética de populações de insetos e ácaros são, agora, os microssatélites, os quais são regiões do genoma não codantes que apresentam repetições de poucos pares de bases. Microssatélites apresentam suficiente variabilidade para uso em muitos tipos de estudos populacionais incluindo estudos de origem de indivíduos, estrutura populacional e hibridização. Lócus microssatélites devem ser determinados para cada nova espécie, ou grupos de espécies próximas (Navajas & Roderick 2008).

Aspectos críticos para a utilização de ferramentas moleculares em sistemática

A errônea identificação taxonômica de espécimes utilizados para a obtenção de sequências de DNA é um problema crescente para os diferentes grupos de organismos e representa uma séria ameaça para a utilização das sequências depositadas em bases de dados públicas de DNA. Este problema compromete as conclusões obtidas em estudos ecológicos e filogenéticos em que estas sequências foram utilizadas (Holst-Jensen *et al* 2004). Várias publicações têm evidenciado o problema de incorreta atribuição de sequências em bancos de dados (Ruedas *et al* 2000, Vilgalys 2003), que em alguns casos é extremo. Dessa forma, o principal desafio da abordagem do código de barras do DNA tornou-se a identificação dos táxons (De Salle *et*

al 2005), isto é, um desafio de natureza taxonômica e, não, técnico (Nilsson *et al* 2006).

Este problema também tem sido apontado nas áreas de Entomologia e Acarologia. O grupo dos mosquitos anofelinos é composto por complexo de espécies de difícil caracterização morfológica. Revisando 174 acessos do GenBank da região ITS2 de anofelinos da América Latina, Marrelli *et al* (2006) observou uma alta variabilidade intraespecífica (de 0,2 a 19%), o que levou os autores a concluir que há erros de atribuição incorreta de sequências de DNA a táxons ou, menos provável, erros no seqüenciamento, que podem ser responsáveis por estes altos valores de divergência. Mendonça *et al* (2011) também apresentou evidências de identificações incorretas de ácaros fitófagos em sequências do GenBank. Estes autores trabalharam com ácaros de teia do gênero *Tetranychus* e avaliaram a identidade de 105 acessos do GenBank da região ITS2 do rDNA e de 138 seqüências do COI do mtDNA, juntamente com novas seqüências obtidas. Numerosos casos de identificação errônea foram apontados envolvendo principalmente *T. urticae*, *T. cinnabarinus*, *T. kanzawai* e *T. truncatus*. Os resultados sugeriram que cerca de 30% das seqüências estudadas não eram confiáveis (erroneamente identificadas ou dúbias). Estes trabalhos evidenciam a necessidade de realizar uma detalhada identificação morfológica como subsídio básico para os estudos moleculares.

A preservação de *voucher* espécimes a partir dos quais foram obtidas seqüências de DNA deveria ser um requerimento obrigatório para dar confiabilidade à utilização das seqüências em estudos de sistemática molecular, entretanto, na maioria dos casos, isso não vem ocorrendo. Ruedas *et al* (2000) constatou que em mais de 70% (41 de 56) dos artigos publicados em quatro números do periódico *Molecular Phylogenetics and Evolution* não fornece informações sobre *voucher* espécimes, impossibilitando verificar e validar a identificação dos espécimes que geraram as seqüências.

Outro ponto importante a ser considerado na utilização de ferramentas moleculares em sistemática de insetos e ácaros é a utilização de métodos não destrutivos de extração de DNA, os quais permitem a preservação de *voucher* espécimes (Rowley *et al* 2007). Este problema é mais crítico para ácaros, por suas reduzidas dimensões. Os protocolos mais comumente utilizados para extração de DNA de ácaros incluíam a maceração dos espécimes durante os primeiros passos da extração de DNA, tornando impossível sua posterior preservação. Recentemente, alguns protocolos de

extração de DNA não destrutivos foram descritos (ver Dabert *et al* 2008). No caso dos insetos pode-se utilizar para a extração de DNA apenas parte de um tecido do espécime (por exemplo, uma perna) ou, no caso de espécimes pequenos, imersão em tampões de extração, de onde será extraído DNA, seguido de recuperação e preservação do espécime (Rowley *et al* 2007).

As vantagens e desvantagens da utilização de um único espécime ou de um *pool* de espécimes para extração de DNA também devem ser consideradas nos estudos moleculares de insetos e ácaros. Especialmente no caso de ácaros muitos autores têm utilizado um *pool* de espécimes para obtenção de DNA ao invés de um único indivíduo. O problema na utilização de um pool de indivíduos é menor no caso de espécies que se reproduzem por partenogênese arrenótoca, pois provavelmente espécimes coletados de uma única colônia são clones ou geneticamente muito próximos, de modo que a diversidade genética é reduzida. Entretanto, deve-se ter cuidado para espécies que se reproduzem sexualmente e não formam colônias. Neste caso, trabalhar com um *pool* de indivíduos pode levar à perda de informação ou mesmo a resultados imprecisos, pois a amostra pode conter indivíduos geneticamente divergentes, de áreas distantes (Navajas & Navia 2010). Este problema também vem sendo solucionado com a adaptação e utilização de protocolos mais eficientes que permitem a extração de DNA de um único indivíduo.

Considerações finais

Atualmente considera-se que a integração de fontes de informação independentes e complementares – por exemplo, dados moleculares, detalhado estudo morfológico, dados biológicos, ecológicos e comportamentais – possibilitam a construção de uma sistemática sólida dos para os diversos grupos de organismos. Esta abordagem multidisciplinar tem sido chamada de “Taxonomia Integrativa” (Bickford *et al.* 2007), e, neste contexto, os dados moleculares são considerados uma fonte valiosa de informação.

Referências

Armstrong KF, Ball SL (2005) DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360:1813-1823.

- Awise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann Rev Ecol Syst* 18: 489-522.
- Behura SK (2006) Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Mol Ecol* 15: 3087-3113.
- Ben-Ali Z, Boursot P, Said K, Lagnel J, Chatti N, Navajas M (2000) Comparaison of ribosomal ITS regions among *Androctonus* spp. scorpions (Scorpionida: Buthidae) from Tunisia. *J Med Entomol* 37: 787-790.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol* 22: 148-155.
- Birungi J, Munstermann LE (2002) Genetic structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations based on mitochondrial ND5 sequences: evidence for an independent invasion into Brazil and United States. *Genet* 95: 125-132.
- Bonizzoni M, Zheng L, Guglielmino CR, Haymer DS, Gasperi G, Gomulski LM, Malacrida AR (2001) Microsatellite analysis of medfly bioinfestations in California. *Mol Ecol* 10: 2515-2524.
- Calcagno V, Bonhomme V, Thomas Y, Singer MC, Bourguet D (2010) Divergence in behaviour between the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, and its sibling species *Ostrinia scapularis*: adaptation to human harvesting? *Proc R Soc Lond B* 277: 2703-2709.
- Caterino MS, Cho S, Sperling FAH (2000) The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of Babel. *Ann Rev Entomol* 45: 1-54.
- Clarke AR, Walter GH (1995) "Strains" and the classical biological control of insect pests. *Can J Zool* 73: 1777-1790.
- Dabert J, Ehrnsberger R, Dabert M (2008) *Glaucalges tytonis* sp.n. (Analgoidea, Xolalgidae) from the barn owl *Tyto alba* (Strigiformes, Tytonidae): compiling morphology with DNA barcode data for taxon descriptions in mites (Acari). *Zootaxa* 1719: 11.
- Darling JA, Blum MJ (2007) DNA-based methods for monitoring invasive species: a review and prospectus. *Biol Invasions* 9: 751-765.

- DeSalle R, Egan MG, Siddall M (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360: 1905-1916.
- Excoffier L, Heckel G (2006) Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nat Rev Genet* 7: 745-758.
- Facon B, Pointier JP, Jarne P, Sarda V, David P (2008) High genetic variance in life-history strategies within invasive populations by way of multiple introductions. *Curr Biol* 18: 363-367.
- Fagan W, Lewis M, Neubert M, van den Driessche P (2002) Invasion theory and biological control. *Ecol Lett* 5: 148-157.
- Garant D, Kruuk L (2005) How to use molecular marker data to measure evolutionary parameters in wild populations. *Mol Ecol* 14: 1843-1859.
- Gariepy TD, Kuhlmann U, Gillott C, Erlandson M (2007) Parasitoids, predators and PCR: the use of diagnostic molecular markers in biological control of Arthropods. *J Appl Entomol* 131: 225-240.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B* 270: 313-321.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14812-14817.
- Henry CS, Wells MM (2010) Acoustic niche partitioning in two cryptic sibling species of *Chrysoperla* green lacewings that must duet before mating. *Anim Behav* 80: 991-1003.
- Hillis DM, Dixon MT (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart Rev Biol* 66:411-453.
- Holst-Jensen A, Vralstad T, Schumacher T (2004) On reliability. *New Phytol* 161: 11-13.
- Hoy MA (1994) Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications. San Diego, Academic Press, 546p.
- Hoy MA (2011) Agricultural Acarology: introduction to integrated pest management. Boca Raton, FL, CRC Press, 430p.

- Marrelli MT, Sallum MAM, Marinotti O (2006) The second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA as a tool for Latin American anopheline taxonomy—a critical review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 817-832.
- Mendonça RS de, Navia D, Diniz IR, Auger P, Navajas M (2011) A critical review on some closely related species of *Tetranychus* sensu stricto (Acari: Tetranychidae) in the public DNA sequences databases. *Exp Appl Acarol* doi: 10.1007/s10493-011-9453-5
- Navajas M, Boursot P (2003) Nuclear ribosomal DNA monophyly versus mitochondrial DNA polyphyly in two closely related mite species: the influence of life history and molecular drive. *Proc R Soc Lond B (Suppl)* 270: S124-S127.
- Navajas M, Fenton B (2000) The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. *Exp Appl Acarol* 24: 751-774.
- Navajas M, Navia D (2010) DNA-based methods for eriophyoid mite studies: review, critical aspects, prospects and challenges. *Exp Appl Acarol* 51: 257-271. doi: 10.1007/s10493-009-9301-z
- Navajas M, Roderick G (2008) Molecular diagnosis. *ALPHA M.indd* 191-196.
- Navia D, Moraes GJ de, Roderick G, Navajas M (2005) The invasive coconut mite *Aceria guerreronis* (Acari: Eriophyidae): Origin and invasion sources inferred from mitochondrial (16S) and nuclear (ITS) sequences. *Bull Entomol Res* 95: 505-516.
- Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson KH, Kõljalg U (2006) Taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases: A Fungal Perspective. *PLoS ONE* 1: e59.
- Paterson HEH (1991) The recognition of cryptic species among economically important insects, p.1-10. In Zalucki MP (ed) *Heliothis: Research Methods and Prospects.*, Springer-Verlag, New York, 233p.
- Pfenninger M, Schwenk K (2007) Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evol Biol* 7: 121. doi:10.1186/1471-2148-7-121.
- Roderick GK (1996) Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Ann Rev Entomol* 41: 325-352.

- Roderick GK, Navajas M (2003) Genes in new environments: genetics and evolution in biological control. *Nature Rev Genet* 4: 889-899.
- Ross KG, Shoemaker D, Krieger MJ, Deheer CJ (1999) Assessing genetic structure with multiple classes of molecular markers: a case study involving the introduced fire ant *Solenopsis invicta*. *Mol Biol Evol* 16: 525-543.
- Rowley DL, Coddington JA, Gates MW, Norrbom AL, Ochoa RA, Vandenberg NJ, Greenstone MH (2007) Vouchering DNA-barcoded specimens: test of a nondestructive extraction protocol for terrestrial arthropods. *Mol Ecol Notes* 7: 915-924.
- Ruedas LA, Salazar-Bravo J, Dragoo JW, Yates TL (2000) The importance of being earnest: what, if anything, constitutes a “specimen examined?” *Mol Phylogenet Evol* 17: 129-132.
- Schlick-Steiner BC, Steiner FM, Seifert B, Stauffer C, Christian E, Crozier RH (2010) Integrative Taxonomy: A Multisource Approach to Exploring Biodiversity. *Ann Rev Entomol* 55: 421-438.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994) Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am* 87: 651-701.
- Solé-Cava AM (2008) Código de Barras de Dna – o Rabo que Abana o Cachorro. *Ciência Hoje* 245: 65-67.
- Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol Evol* 15:199-203.
- Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH, Vogler AP (2003) A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol Evol* 18: 70-74.
- Vilgalys R (2003) Taxonomic misidentification in public DNA databases. *New Phytol* 160: 3-4.
- Weekers PHH, Jonckheere JF, Dumont HJ (2001) Phylogenetic relationships inferred from ribosomal ITS sequences and biogeographic patterns in representatives of the genus *Calopteryx* (Insecta: Odonata) of the west Mediterranean and adjacent west European zone. *Mol Phylogenet Evol* 20: 89-99.