

동 · 물 · 학 · 논 · 단

미토콘드리아의 핵산염기서열을 이용한 곤충 분자계통학의 현황과 전망: 과실파리과(Tephritidae)의 예



한 호 연

1975~1979 고려대학교 생물학과 (생물학) 학사
 1981~1983 고려대학교 생물학과 (동물학) 석사
 1986~1988 펜실베이니아주립대학 곤충학과 (곤충학) 석사
 1988~1992 펜실베이니아주립대학 곤충학과 (곤충학) 박사
 1992~1995 펜실베이니아주립대학 박사후 연구원
 1995~현재 연세대학교 문리대학 생명과학과 조교수

1. 서 론

근래에 들어 Polymerase Chain Reaction (PCR) 방식의 보급 등 분자생물학 기술의 일반화에 힘입어 많은 분자계통학적인 연구가 수행되고 있다. 이는 고전분류학적 형질들의 사용만으로는 해결할 수 없었던 많은 계통적인 의문사항들을 새로운 각도에서 검증할 수 있는 기반을 마련하였다는 데 큰 의의를 찾을 수 있다. 현재 여러 분류군 중 척추동물이나 식물 등에 있어서는 분자계통학적인 연구에 상당한 진전이 있었으나, 분류군 중 가장 다양성이 큰 곤충류에 있어서는 이같은 연구가 아직 미미한 실정이다. 본인은 지난 수년간 과실파리과 (=광대파리과, Tephritidae)의 분자계통학적인 연구를 해 왔으며, 상위분류체계 확립에 도움이 될만한 결과를 얻은 바 있다. 따라서, 이 연구가 곤충류의 과 수준 이하 분자계통학적 연구를 계획하는 연구자들에게 도움이 될 것으로 생각되어 다음과 같

이 그동안의 연구 내용을 요약하여 발표한다.

과실파리과는 파리목(Diptera)내에서 가장 큰 과중의 하나로 전 세계적으로는 약 500속 4,000종 이상이 기록되어 있다. 또한 농업해충학적인 측면에서 볼 때 파리목 중 가장 중요한 과(Family)로 알려져 있다. 이들은 특히 동남아시아를 비롯한 열대 및 아열대 지방에서 수많은 과일류에 극심한 피해를 주는 해충들로 알려져 있으며, 이 지역들과의 교역증대에 따라 우리나라에서도 과실파리과에 대한 정확한 파악이 시급히 요구된다 할 수 있다. 과실파리에 대한 연구는 다음과 같은 순수 생물학적인 측면에서도 많이 진행되었다: 화학생태학(chemical ecology); 먹이찾는 습성(foraging behavior); 종화(speciation) 등등.

이같이 광범위한 학술적이고도 경제적인 중요성에도 불구하고 과실파리과의 분류체계는 아직도 계통적으로 심도 있게 정리되어 있지 못한 상태이다. 이런 상황은 다음과 같은 세 가지 원인에 기인한다고 할 수 있다: 1) 과거 대부분의 과실파리과의 분류학적인 연구가 지역적으로 국한 되어 있었기 때문에 범 세계적인 분류군들에 대한 비교분석이 이루어지지 않았고; 2) 과실파리과는 지질학적으로 볼 때 상대적으로 단시간(4~6천만년) 내에 폭발적으로 적응진화(adaptive radiation)한 분류군으로 알려져 있으며, 이에 따라 고전분류학적인 연구에 주로 사용되는 형태적인 형질들의 평행 및 수렴진화(parallelism and convergence)현상이 매우 흔하다; 3) 과실파리과는 수많은 분류군을 포함하고 있음에도 불구하고 전세계적으로 매우 적은 수의 학자들만이 계통분류학적인 연구를 하고 있는 실정이다.

2. 과실파리과의 분류체계와 연구목적

과실파리과는 근연 분류군들과는 달리 거의 대부분의 종들이 초식성 (phytophagy)일 뿐 아니라 아전연맥 (subcosta)의 형태로도 뚜렷하게 구분이 될 수 있어서 많은 학자들이 이들을 단계통군 (monophyletic group)으로 간주하고 있으나, 과 내의 상위분류체계는 학자에 따라 아직 많은 차이가 있다. 최초의 범 세계적 상위분류체계 정립을 위한 연구는 Hering (1947)에 의해서 이루어졌으며, 그 후 Hering의 분류법식은 많은 학자들에 의해 변형 및 추가가 되었으나 아직도 학자들간의 폭넓은 일치가 이루어지고 있지 않은 상황이다. 동양구의 상위 분류는 Hardy (1973, 1974, 1977)에 의해서 연구되었고, 구열대구는 Cogan과 Munro (1980)가, 신열대구는 Foote (1980)가, 신북구는 Foote *et al.* (1993)이 각각 연구하였다. 아과 및 족들을 포함하는 상위분류군들에 대한 범 세계적 분지학적 (cladistics) 측면의 연구는 Hancock (1986a)에 의해 처음으로 이루어졌으나, 형질분석의 문제로 인해서 상위분류체계 향상에 큰 도움이 되지 못하였다.

최근에 들어 과실파리과에 대한 생태적인 지식의 증가와 응성 및 자성생식기 관찰을 이용한 보다 정밀한 형질검증방법의 광범위한 사용과 진화계통학적인 방법론의 도입으로 인해 어느 정도 상위분류체계의 향상을 가져올 수 있었다 (Freidberg 1985; Korneyev 1985; Hancock 1986a; Norrbom 1987; White & Korneyev 1989; Han 1992; Han *et al.* 1993; Foote *et al.* 1993). 이같은 기존 문헌상의 정보를 종합하면, 많은 아과와 족들이 단계통군으로 정의됐으나, 그들 간의 유연관계는 거의 조명이 되지 못한 상태이다. 특히 Trypetinae 아과는 단계통군으로 믿어지는 다른 두 아과들을 제외한 나머지 상위분류군의 원시형질 (plesiomorphic characters)들을 기초로 해서 정의된 측계통군 (paraphyletic group)으로 생각된다.

본인은 고전분류학적인 연구에서 제기된 상위분류군들의 유연관계에 대한 가설을 분자생물학적인 접근방법을 통하여 검증함으로써 보다 계

통적인 분류체계를 확립하는 것을 목표로 하여 이 연구를 추진하고 있다. 여태까지 진행된 본인의 연구는 미토콘드리아내에 있는 여러가지 유전자 중 16S 리보솜의 염기서열을 이용하여 과 내의 속 이상 상위분류군들 간의 유연관계를 밝히는 것을 그 목적으로 하고있다.

3. 미토콘드리아 DNA (mtDNA)의 곤충 분자계통학적인 이용

근래에 들어 동물의 mtDNA의 염기서열이 계통분류학의 연구에 많이 사용되어 왔다. 특히 곤충분류학에서는, 미토콘드리아 DNA내에 있는 몇 종류의 단백질유전자, transfer RNA 유전자, 리보솜 RNA 유전자 등이 개체군부터 목 수준의 계통학적인 연구에 사용되어 왔다. 이같은 연구의 전반적인 상황은 Simon *et al.* (1994)에 의해서 최근에 정리된 바 있다. 우리나라에서는 아직 곤충분류학에서 이와 같이 염기서열을 이용하는 연구가 진행되지 않고 있는 상태이다. 전세계적으로도 과실파리과의 계통분류 연구에 염기서열 분석을 시도하는 것은 본인이 처음인 것으로 생각된다.

동물의 미토콘드리아 DNA (mtDNA)는 다음과 같은 몇 가지 특성 때문에 계통학적인 연구에 적합하다고 할 수 있다. 첫째, 수많은 mtDNA분자가 각 세포 내에 존재하므로, 세포 당한 조씩만 존재하는 핵 내의 DNA부분보다 PCR로 증폭될 확률이 훨씬 크다. 결과적으로 mtDNA의 부분들은 알코올이나 건조표본에서도 용이하게 sequencing될 수 있다는 잇점이 있다. 본인은 이미 20년 이상 된 알코올 또는 건조표본들을 재료로 약 1,000개 정도의 염기를 분석한 바 있으며, 이번 연구에 사용될 상당수의 표본들이 건조표본임을 감안할 때 이같은 특성은 상당히 중요한 기술적 잇점이라 볼 수 있다. 둘째, mtDNA 각 부분들이 각기 다른 속도로 진화한다는 점이다. 예를 들자면, 콘트롤리전 (control region)은 중간이나 종 내에서 비교해 볼 때 매우 빨리 진화하는 반면, 리보솜 RNA 유전자 (rDNA)들은 느리게 진화하여 어떤 부분에 있어서는 진핵생물 내에서까지도 많이 변하지 않은 곳도 있다 (Hixon & Brown 1986). 이같은

부분별 진화속도의 차이는 mtDNA의 여러 유전자들이 개체군 수준부터 상위분류군까지의 계통분류학적 연구에 광범위하게 이용될 수 있었던 주요 원인이다. 이번 연구에서는 과거 본인에 의해 속(genus)부터 족(tribe)수준까지의 연구에 적합하다고 밝혀진 미토콘드리아의 16S 리보솜 유전자(16S rDNA)의 염기서열을 분석하였다.

4. 실험방법

핵산추출방법은 한 개체의 파리를 재료로 실험할 수 있도록 개발된 표준 실험방식을 택하였다(Sheppard *et al.*, 1992). 그러나 건조표본이나 액침표본에 한해서는 본인이 개발한 방식을 썼다.

이 방식에서는 섭씨 55도에서 proteinase-K 등을 사용 30분간 재료를 데우는 등 몇 가지 방법을 개선하여 핵산 추출량이 최대로 될 수 있도록 하였다. 제작된지 약 5년이 지난 건조표본이나 액침표본에서도 실험에 지장이 없을 정도의 충분한 양의 DNA를 이 방법으로 추출하여 실험에 사용하고 있으며, 20년 이상된 표본에서도 약 1,000염기 정도를 분석한 바도 있다. 이미 추출된 핵산으로부터 16S rDNA부분을 PCR 방식으로 증폭한 뒤 다시 아가젤 전기영동(agarose gel electrophoresis)으로 분리시킨다. 이렇게 분리된 DNA에서 다시 비상칭적(Asymmetrical)PCR로 많은 단사상 핵산(single stranded DNA)들을 증폭시킨 후 직접 염기서열 분석실험에 이용하였다. 염기서열분석은 Sequenase(version 2.0)를 이용하는 dideoxy chain termination 방식을 이용하였다.

5. 염기서열을 이용한 계통분석

일단 각 종별로 확인된 염기서열들은 CLUSTAL 소프트웨어(Higgins & Sharp 1989)를 사용 정렬(aligning)하였으며 이는 다시 ESEE 소프트웨어(Cabot & Beckenbach 1986)를 사용 수정하였다. 과실파리과내의 염기서열 정렬은 염기의 결손이나 추가가 상대적으로 적은 관계로 해서 그리 어렵지 않게 수행되어 왔다. 계통수 분석을 위해서는 다음과 같은 소프트웨어들

을 주로 사용하고 있다: PAUP(ver. Maddison & Maddison 1992); MEGA(ver. 1.0, Kumar *et al.* 1993); NJBOOT2(ver. 1.05, Tamura 1992); MEtree(ver. 1.2, Rzhetsky & Nei 1992).

많은 계통학적인 분석방법들이 한정적인 숫자의 가정들에 기반하고 있으므로 실제로 분석에 사용될 유전자 부위의 진화적 특성에 대하여 이해하는 것이 보다 정확한 분석을 위한 선결 과제라 하겠다. 본인은 지난 수년간 미토콘드리아의 16S rDNA를 연구하여 왔으므로 이 부분에 대한 몇 가지 특성을 기술할 수 있다. 과실파리과의 평균 염기 구성비는 A:T:G:C가 37:43:7:12로 A와 T에 크게 편향되어 있다. 이 비율은 각 종별로 편차가 매우 작을 뿐 아니라, 다른 파리목 내의 과들에서도 비슷한 비율을 나타내고 있다. 따라서 이같은 비율을 유지하기 위해 진화적으로 비상칭적인 염기교체가 일어나 왔음을 추측할 수 있다. 과실파리과의 계통도를 토대로 염기교체 숫자를 계산한 도표가 이를 잘 나타내고 있다(그림 1A). McClade를 이용하여 계통적인 무게(phylogenetic weight)를 산출해보면 서로 다른 종류의 염기교체가 확률 상으로도 매우 큰 차이가 있음을 알 수 있다(그림 1B). 또한 트랜지션/트랜스버전(transition/transversion=Ts/Tv)비율을 유전적 거리와 비교한 도표를 만들 것 같으면, 비율이 처음에는 2 이상으로 높다가 곧 중복적인 염기교체(multiple substitution)로 인해 0.5 정도로 감소함을 관찰할 수 있다(그림 3D).

이의 원인은 각 종류의 염기교체를 개별적으로 도식화 할 경우 잘 알 수 있다(그림 3A, B). 예를 들자면 트랜지션 A-G는 처음에는 높았다가 곧 A-T와 T-G 트랜스버전으로 인해 가려짐을 관찰할 수 있다(그림 1A, 3C). 그러나 16S rDNA가 Ts/Tv의 비율이 응집점(saturation point) 이하에 이르렀을 경우에도 과수준 이하에서는 아직도 계통학적인 정보를 많이 가지고 있는 이유는, A-G를 제외한 모든 염기교체가 유전적 거리의 증가와 거의 정비례하고 있기 때문인 것으로 사료된다(그림 3A, B). 이외에도 rDNA내의 부분 부분들이 각기 다른 속도로 진

화한다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다 (Hillis & Dixon 1991, Simon *et al.* 1994). 과실파리과의 두 염기서열 자료를 계통도와 비교 분석했을 경우 두 도표가 상당히 비슷한 변화 상을 보여주고 있다(그림 2A, B). 이는 16S rDNA에 있어서도 부분별로 진화 속도가 다르다는 것을 보여주는 것으로 생각된다.

위에서 고찰한 바와 같이 과실파리과의 16S rDNA는 다양한 제한요소 하에서 진화하는 것으로 보이며, 따라서 이같은 가정들을 기반으로 해서 개발된 계통수 계산방법을 선택하거나 또는 이같은 제한요소에 최소한의 영향을 받는 계

산방식을 사용하는 것이 중요하다. 현재 100가지가 넘는 계통수 계산방식이 알려져 있으며, 이들중 가장 적합한 방법을 선택하는 것은 상당히 힘든 일이다. 다행히 근래에 들어 시뮬레이션검증(simulation test) 등을 통해 각 방식들을 비교 분석하는 연구가 많이 진척이 되었다(Nei 1991; Hasegawa & Fujiwara 1993; Huelsenbeck & Hillis 1993; Kim *et al.* 1993; Kuhner & Felsenstein 1994; Tateno *et al.* 1994). 이같은 연구의 한가지 재미있는 공통적 결론은, 이질적인 진화경향(rate heterogeneity)을 가지는 염기서열의 경우 간단한 네이버조이닝(neighbor-joining=NJ)방식이 여러 면에서 상당히 효율적이라는 것이다. 반면 현재 많이 쓰여지고 있는 파시모니나 UPGMA방식은 이같은 제한요소들에 부정적인 영향을 받는 것으로 나타났다. 결국 이같은 제한요소들이 존재할 것으로 믿어지는 과실파리과의 rDNA 분석을 위해서는 네이버조이닝방식의 선택이 일단은 가장 적합할 것으로 생각된다. 그러나 본인의 연구에서는 네이버조이닝방식 이외에도 파시모니 또는 UPGMA방식 등도 같이 사용하여 비교 분석하였다. 경험적으로 볼 때 여러 방식을 사용해도 일치해서 나타나는 유연관계는 상당히 신빙성이 있는 것으로 인정되어 왔는데(Avise 1994), 이것이 근래 와서 시뮬레이션검증으로 확인되고 있다(Kim 1993). 이같이 작성된 계통도들의 통계적인 신뢰도는 부스트랩(bootstrap)이나 스탠다드에러(standard error)방식 등을 통해 계산하였다(Felsenstein 1988; Zhetsky & Nei 1992;

(A) Number of Substitutions

from \ to	A	C	G	T
A		4	77	87
C	1		0	10
G	26	0		16
T	112	21	29	

(B) Phylogenetic Weights

from \ to	A	C	G	T
A		20	2	1
C	20		20	1
G	1	20		20
T	1	20	16	

그림 1. (A) 과실파리과의 네이버조이닝 계통수를 토대로 계산된 평균 염기 변화수 (과실파리과 *Anastrepha* 속). (B) 각 염기별 변화의 빈도에 입각하여 산출된 계통적 비중 (phylogenetic weight-범위: 1-20).

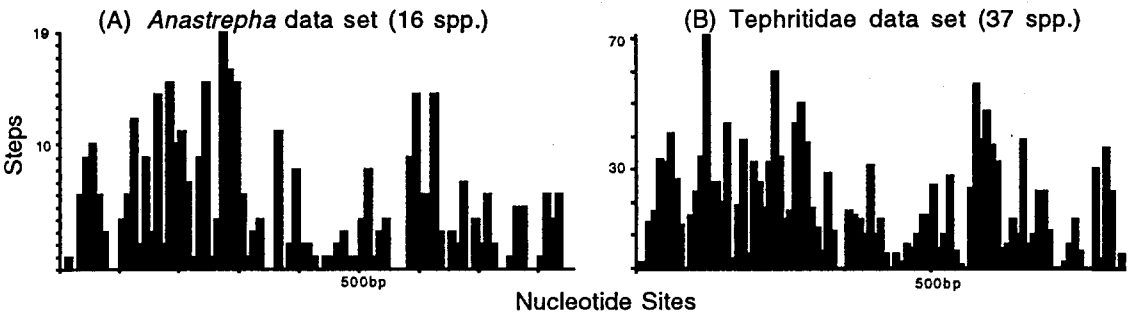


그림 2. 각 10개 염기 단위당의 변화를 네이버조이닝 계통도를 토대로 작성한 도표. 과실파리과를 자료로한 두 개의 염기서열 데이터에 입각 작성.

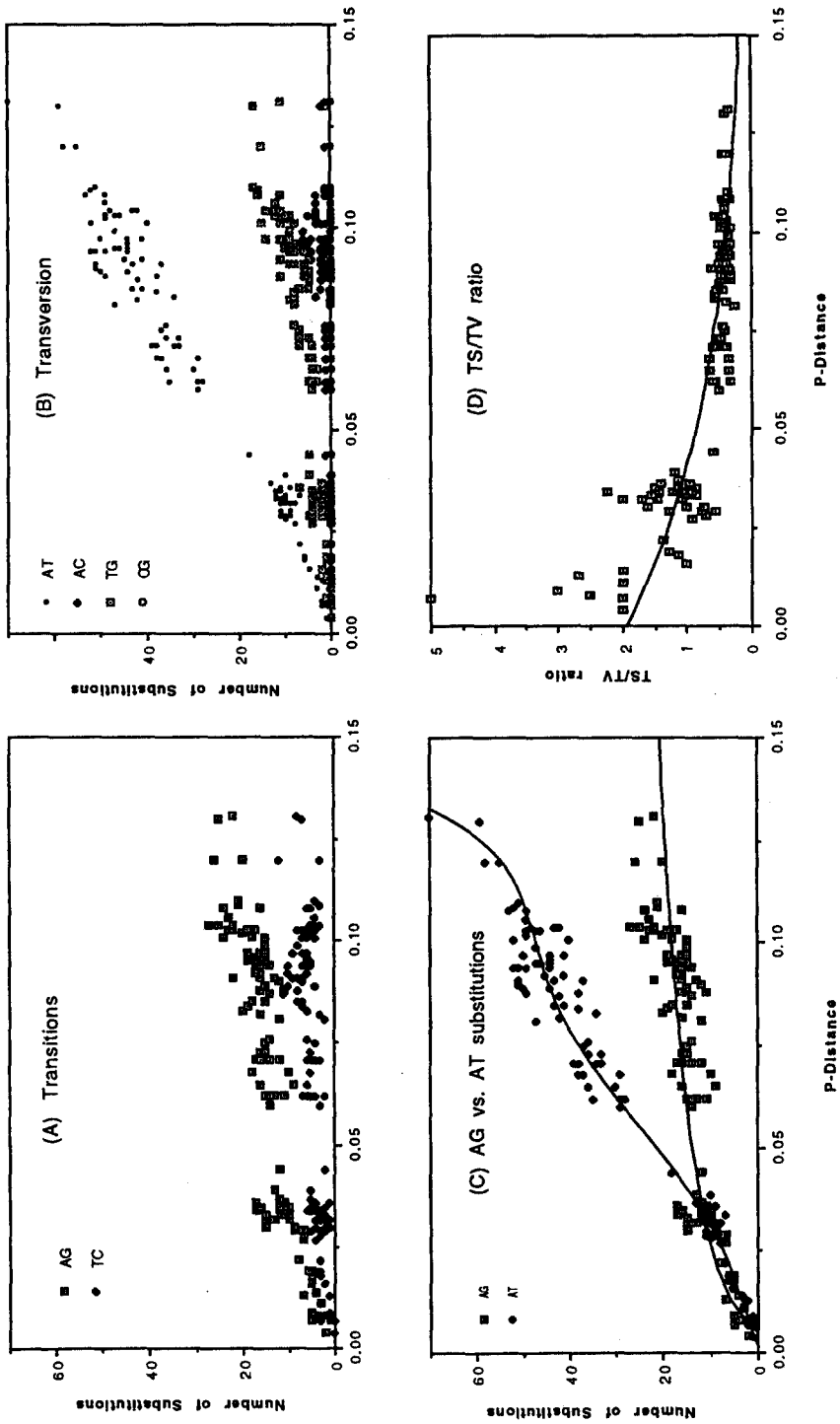


그림 3. 과실파리과 내의 *Anastrepha* 속 (16종 비교)에 있어서 mt 16S rDNA의 염기교체 빈도수 (A-C)와 트랜지션/트랜스버전 비율 (D)을 유전적 거리와 비교 작성한 도표.

Kumar *et al.*, 1993).

6. 연구결과와 앞으로의 전망

과실파리과의 근연 과를 대표하는 2종과 과실파리과 35종으로부터 925 bp의 염기서열을 분석한 결과를 소개하면 다음과 같다. Kimura-2 parameter model을 사용한 네이보조이닝 계통도를 볼 것 같으면, 현재 알려져 있는 과실파리과의 상위분류체계와 거의 일치하며, 이에 덧붙여 몇 가지 새로운 계통정보도 보여주고 있다 (그림 4). 스탠다드에러 (standard error) 방식에 의한 통계적 검증을 했을 때 유의성이 있다고 판단되는 유연관계 중 주목할만한 사항을 요약하면 다음과 같다:

- (1) *Parastenopa*속을 제외한 Trypetini족이 단계통군이라는 것;
- (2) *Platyparea*족이 Tephriti-

nae아과의 근연 분류군일 가능성; (3) *Hexachaeta*속과 *Toxotrypanini*족의 유연관계; (4) *Dacinae*아과가 단계통군이라는 것과 *Oedicarena*속과의 유연관계; (5) *Adramini*족이 단계통군이라는 것; (6) *Rhagoletis*속이 단계통군이 아닐 가능성. 이와 같은 결과는 16S rDNA 염기서열이 기존의 계통에 관한 가설을 검증하는데 유용할 뿐 아니라 새로운 유연관계에 관한 추가적인 가설을 제시해 줄 수 있는 도구로서 사용될 수 있다는 것을 보여주고 있다. 그러나 이 결과가 과실파리과 상위분류체계의 모든 수준에서 포괄적인 계통정보를 밝혀주지는 않았다. 그림 4에서 보는 바와 같이 죽이나 아과 간의 유연관계에 대한 통계적 신뢰도가 매우 낮았다. 이는 아마도 과실파리과의 진화 초기에 폭발적인 적응방산 (adaptive radiation)에 의해 과실파리과의

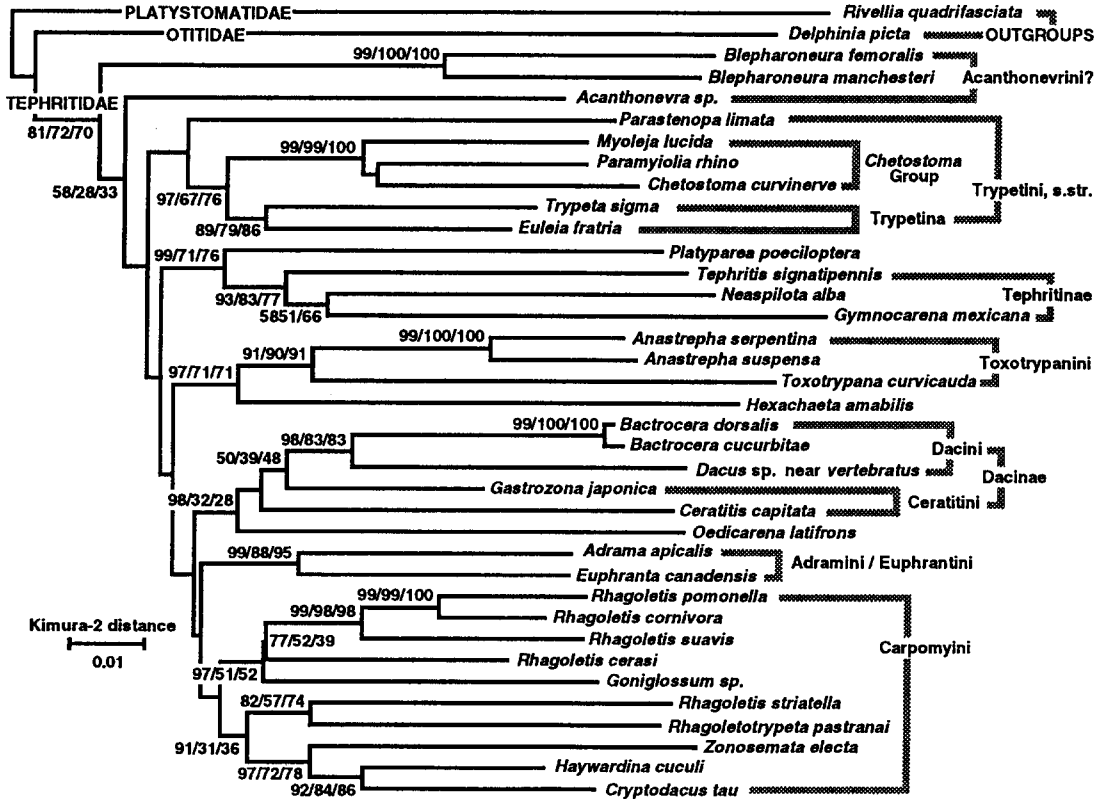


그림 4. 키무라-2 (Kimura-2) 유전거리에 입각 네이보조이닝 (neighbor-joining) 방식으로 작성한 과실파리과의 계통도. 계통도상의 번호는 두가지 통계적 검증에 의한 신뢰도를 나타낸다 (standard error test/boots-trap test). 이 계통도는 종당 약 900 염기서열 (16S mt rDNA)을 사용하여 작성함.

많은 상위분류군이 짧은 시간내에 형성되었을 것으로 사료되며, 이를 검증하기 위하여 더욱 많은 분류형질이 필요할 것으로 생각된다.

지금까지 설명한대로 16S rDNA는 극심한 A+T bias 등 이질적인 진화경향을 보임에도 불구하고 과실파리과의 진화의 역사를 규명하는데 상당히 유용하다는 결론을 내릴 수 있다. 이번 연구에서는 925 bp의 염기를 분석했으며 이는 전체 16S rDNA의 약 70% 정도가 된다. 따라서 약 3~400 bp의 나머지 16S rDNA 정보와 16S rDNA와 비슷한 속도로 진화하는 것으로 알려진 12S rDNA 중 기술적으로 PCR sequencing이 용이한 약 600 bp 정도를 추가시킨다면, 이번엔 밝힐 수 없었던 아과나 족 간의 관계도 어느 정도 재조명이 가능하다고 생각한다.

참 고 문 헌

- Avise, J.C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hill, New York.
- Cabot, E.L. & A.T. Beckenbach. 1989. Simultaneous editing of multiple nucleic acids and protein sequences with ESEE. *CABIOS* 5:233-234.
- Cogan, B.H. & Munro, H.K. 1980. 40. Family Tephritidae. pp.518-554. In Crosskey, R.W. et al. [eds.], Catalogue of the Diptera of the Afrotropical Region. Br. Mus. Nat. Hist., London.
- Felsenstein, J. 1988. Phylogenies from molecular sequences: Inference and reliability. *Ann. Rev. Genet.* 22:521-565.
- Foote, R.H. 1980. Fruit fly genera south of the United States (Diptera: Tephritidae). *U. S. Dept. Agr. Tech. Bull.* 1600:1-79.
- Foote, R.H., F.L. Blanc. & A.L. Norrbom. 1993. Handbook of the Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) of America North of Mexico. Comstock Publ. Assoc., Ithaca, NY.
- Freidberg, a. 1985. The genus *Craspedoxantha* Bezzi (Dipter: Tephritidae: Tereliinae). *Ann. Natal Mus.* 27:182-206.
- Han, H.-Y. 1992. Classification of the tribe Trypetini (Diptera: Tephritidae: Trypetinae). Ph.D. thesis, Pennsylvania State University.
- Han, H.-Y., X.-J. Wang, & K.C. Kim. 1993. Revision of *Cornutrypeta* Han and Wang, a new tephritid genus proposed for Oriental and Palaearctic species (Diptera: Tephritidae). *Ent. Scand.* 24:167-184.
- Hardy, D.E. 1973. The fruit flies (Tephritidae-Diptera) of Thailand and bordering countries. *Pacif. Ins. Monog.* 31:1-353.
- Hardy, D.E. 1974. The fruit flies of the Philippines (Diptera: Tephritidae). *Pacif. Ins. Monog.* 32:1-266.
- Hardy, D.E. 1977. Family Tephritidae. Pp. 11-134. In Delfinado, M.D. & D.E. Hardy [eds.]. A Catalog of the Diptera of the Oriental Region. Suborder Cyclorrhapha. University Press of Hawaii, Honolulu.
- Hasegawa, M. & M. Fujiwara. 1993. Relative efficiencies of the maximum likelihood, maximum parsimony, and neighbor-joining methods for estimating protein phylogeny. *Mol. Phyl. Evol.* 2:1-5.
- Hering, M. 1947. Bestimmungstabelle der Unterfamilien und tribus der Trypetidae. *Sru-na Seva* 6:12-16.
- Higgins, D.G. & P.M. Sharp. 1989. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *CABIOS* 5:151-153.
- Hillis, D.M. & M.T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart. Rev. Biol.* 66:441-453.
- Hixon, J.E. & W.M. Brown. 1986. A comparison of the small ribosomal RNA genes from the mitochondrial DNA of the great apes and humans: sequence, structure, evolution, and phylogenetic implications. *Mol. Biol. Evol.* 3:1-18.
- Huelsenbeck, J.P. & D.M. Hillis. 1993. Succ-

- ess of phylogenetic methods in the four-taxon case. *Syst. Biol.* 42:247-264.
- Kim, J. 1993. Improving the accuracy of phylogenetic estimation by combining different methods. *Syst. Biol.* 42:331-340.
- Kim, J., F.J. Rohlf, & R.R. Sokal. 1993. The accuracy of phylogenetic estimation using the neighbor-joining method. *Evolution* 47:471-486.
- Korneyev, V. 1985. Fruit flies of the tribe Terelliini (Diptera, Tephritidae) in the USSR. *Ent. Oboz.* 64:626-644.
- Kuhner, M.K. & J. Felsenstein. 1994. A simulation comparison of phylogeny algorithms under equal and unequal evolutionary rates. *Mol. Biol. Evol.* 11:32-70.
- Kumar, S., K. Tamura, & M. Nei. 1993. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 1.0. Inst. Molecular Evol. Genetics, Penn State Univ. [software].
- Maddison, W.P. & D.R. Maddison. 1992. MacClade, version 3.03 [software].
- Nei, M. 1991. Relative efficiencies of different tree-making methods for molecular data. pp.90-128. In Miyamoto, M.M. & J. Cracraft [eds.], *Phylogenetic Analysis of DNA Sequences*. Oxford Univ. Press, New York.
- Norrbom, A.L. 1987. A revision of the Neotropical genus *Polionota* Wulp (Diptera: Tephritidae). *Folia Ent. Mex.* 73:101-123.
- Rzhetsky, A. & M. Nei. 1992. A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Mol. Biol. Evol.* 9:945-967.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, & P. Flook. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Ent. Soc. Amer.* 87:651-701.
- Tamura, K. 1992. NJBOOT 2, version 1.05. Copyrighted by K. Tamura [software]
- Tateno, Y., N. Takezaki, & M. Nei. 1994. Relative efficiencies of the maximum-likelihood, neighbor-joining, and maximum-parsimony methods when substitution rate varies with site. *Mol. Biol. Evol.* 11:261-277.
- White, I.M. & V.A. Korneyev. 1989. A revision of the western Palearctic species of *Urophora* (Robineau-Desvoidy). *Syst. Entomol.* 14:327-374.