

321  
385/78  
Jana

ELIANA DE CONTI

de } A2 R  
12/71

VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE  
ESPÉCIES DE SILBA (DIPTERA: LONCHAEIDAE)

Campinas - São Paulo - Brasil

1978

ELIANA DE CONTI

VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE  
ESPÉCIES DE SILBA (DIPTERA: LONCHAEIDAE)

no base *L. lonchaeidae*

Orientadora: Dra. Hebe Myrina  
Laghi de Souza

Tese apresentada ao Instituto  
de Biologia da Universidade Es-  
tadual de Campinas para a ob-  
tenção do título de Mestre em  
Ciências.

Campinas - São Paulo - Brasil

1978

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais e irmãos.

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Hebe Myrina Laghi de Souza, pela orientação, amizade e estímulo que sempre me ofereceu.

A Maria Cecília Del Vecchio, colega de projeto, pela amizade e valioso auxílio na identificação das espécies analisadas.

Ao Dr. João S. Morgante um agradecimento especial, por ter em diferentes etapas deste trabalho franqueado seus préstimos e conhecimentos.

Ao Dr. Ângelo Pires do Prado, pelo valioso apóio, sugestões e auxílio na taxonomia.

Ao Dr. C. Pavan que, como responsável pelo Projeto, tornou possível a realização deste trabalho.

Ao Dr. Aquiles E. Piedrabuena, pelo auxílio na análise estatística e pelas sugestões e discussão do manuscrito.

Ao André Rogatko, pelo processamento dos dados no Centro de Computação Eletrônica da Universidade de São Paulo.

Ao Dr. Lourival C. Mônico, Diretor do Instituto Agrônomico de Campinas, que possibilitou coletas de material nas Estações Experimentais do Instituto.

A todas as pessoas pertencentes às Estações Experimentais de Campinas, Limeira, Monte Alegre do Sul e Louveira pelo valioso auxílio prestado.

D

Ao Dr. Walter A. Hadler, Diretor do Instituto de Biologia da UNICAMP, por ter colocado à nossa disposição um veículo para as coletas do material.

Ao Dr. Otávio H. O. Pavan e Dr. Aldo Malavasi, pelo constante apôio e estímulo e pela revisão e discussão do trabalho.

Ao Dr. Aldo Focesi Jr. e Dr. Rolf Dieter Illg, pelas sugestões e revisão final do manuscrito.

Ao Michel Cytrinovocz, pela amizade, e pelas valiosas sugestões na revisão do manuscrito.

A Vera Lúcia Vaz de Arruda, Iara Duchovni Silva e Ana Maria Marques da Luz, colegas de laboratório, pela amizade e estímulo.

A Wilma Nascimento de Souza, pela amizade e pela eficiência com que me auxiliou na metodologia eletroforética.

A Ana Possenti, Maria Inês Garcia, Alex Caetano dos Santos e Cláudio Gabriel Rocha, pelos valiosos serviços de apôio.

A Esmeralda Zanchetta, pelos desenhos que ilustram o trabalho.

Ao Luiz Eurípedes da Silva, pela datilografia final da tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (SIP/04-049) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (74/282) pelo auxílio financeiro necessário para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	
1.1. O estudo da variabilidade genética em populações de insetos pragas .....	1
1.2. O gênero <u>SILBA</u> (Diptera: Lonchalidae).....	6
1.3. Histórico do Projeto .....	9
1.4. Objetivos .....	10
2. MATERIAL .....	11
3. MÉTODOS .....	16
3.1. Obtenção dos insetos em laboratório .....	16
3.2. Preparação e identificação dos insetos ....	16
3.3. Escolha dos sistemas enzimáticos .....	17
3.4. Eletroferese .....	19
3.4.1. Preparo do gel .....	20
3.4.2. Tampões do gel .....	20
3.4.3. Tampões do eletrodo .....	21
3.4.4. Preparo e aplicação das amostras ..	21
3.4.5. Montagem do equipamento de eletroferese .....	22
3.4.6. Corrente elétrica e tempo de migração	22
3.4.7. Corte, incubação e fixação do gel...	23
3.4.8. Coloração .....	24
3.5. Análise e interpretação dos géis .....	25

F

	Página
3.6. Análise estatística .....	26
4. RESULTADOS .....	28
5. DISCUSSÃO .....	50
5.1. A variabilidade genética do gênero <u>Silba</u> .....	50
5.2. Afinidades genéticas interpopulacionais da es pécie S. <u>pseudopendula</u> .....	55
5.3. Afinidades genéticas interespecíficas do gêne ro <u>Silba</u> .....	57
6. CONCLUSÃO E SUMÁRIO .....	59
7. SUMMARY AND CONCLUSIONS .....	62
8. BIBLIOGRAFIA .....	64
9. APÊNDICE .....	74

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O estudo da variabilidade genética em populações de insetos pragas

A agricultura ocupa, em um país de vasta extensão territorial como o Brasil, um lugar de destaque na economia nacional. Entretanto, com relação a produção agrícola brasileira alguns aspectos devem ser considerados pela real importância com que se revestem.

Um destes aspectos relaciona-se com a própria localização geográfica do país. Sendo o Brasil um país quase que exclusivamente tropical, apresenta grande diversidade biológica representada pela multiplicidade de espécies animais e vegetais. A agricultura brasileira defronta-se portanto com o sério problema da diversidade de pragas agrícolas.

O grupo de pragas que mais se destaca pelos prejuízos causados é o dos insetos fitófagos, que encontram, na diversidade vegetal, disponibilidade de hospedeiros durante o ano inteiro. Aliada a este fato, a alta capacidade colonizadora dos insetos e a sua grande adaptabilidade tornam o controle de pragas pelos métodos usuais dispendioso e pouco eficiente. O problema torna-se ainda mais complexo para as espécies que também possuem hospedeiros silvestres, nos quais não se empregam métodos de controle e que portanto, constituem extensos e contínuos reservatórios naturais.

Em vista disso, uma das maiores preocupações dos técnicos

e pesquisadores de insetos é o desenvolvimento de métodos mais eficientes de controle. A tendência atual baseia-se na utilização simultânea de várias formas de combate em um método denominado por Stern e Cols (1959) de controle integrado. A eficiência dessa metodologia depende de conhecimentos sobre a biologia e ecologia das pragas a serem controladas (Clark, e cols, 1967; Smith e Van den Bosch, 1967). Dessa forma torna-se necessário adquirir um maior conhecimento sobre a maneira pela qual as populações de pragas se adaptam e evoluem em seu meio ambiente. Como a adaptabilidade e o potencial evolutivo de uma população estão intimamente relacionados com a sua variabilidade genética (Dobzhansky, 1970), torna-se importante estimar a variabilidade genética em populações naturais de insetos pragas.

Nos últimos anos desenvolveram-se em vários laboratórios do mundo métodos bioquímicos, como a eletroforese de proteínas, que possibilitaram a análise da variabilidade genética de populações naturais. A eletroforese associada a métodos histoquímicos de detecção de atividade enzimática (Hunter e Markert, 1957) permitiu a detecção de mutações que alteram a estrutura das enzimas, modificando suas mobilidades eletroforéticas, embora mantendo sua atividade catalítica. Assim foram descobertas as múltiplas formas moleculares de uma mesma enzima que Markert e Moller (1959) designaram por isozimas. O termo isozima, segundo a "Commission on Biochemical Nomenclature" (1972), deve ser aplicado somente às formas múltiplas de uma enzima que procedem de diferenças geneticamente determinadas na sua estrutura primária. Entretanto, esse termo vem sendo empregado de forma operacional para as enzimas com a mesma atividade catalítica, separáveis por métodos adequados e cuja natureza da multiplicidade é ainda desconhecida.

Hubby e Lewontin (1966) salientam que a eletroforese, promovendo a separação de enzimas que são produtos de genes específicos, permite em contraste com outras técnicas de análise genética detectar diferenças fenotípicas causadas por substituição alélica em um único loco de um único indivíduo, distinguir substituição alélica em um loco, da substituição alélica em outros locos e investigar uma substancial amostra do genoma que seja ao acaso quanto aos efeitos fisiológicos e grau de variação. Além disso a eletroforese permite a análise de indivíduos obtidos diretamente da natureza sem a necessidade de sua manutenção em laboratório.

Sabe-se entretanto, que as estimativas baseadas em eletroforese são aproximadas, pois além da exclusão dos genes reguladores da fração do genoma amostrada (Hubby e Lewontin, 1966), somente cerca de 26 a 27% dos de substituição de aminoácidos podem ser detectáveis (Shaw, 1965).

Apesar das limitações inerentes à própria técnica, a eletroforese teve um papel decisivo no avanço de estudos de genética de populações e evolução de insetos (revisão de Wagner e Selander, 1974), pois constitui ainda o melhor instrumento para estudos da variabilidade genética de populações.

A utilização dessa técnica em estudos de variabilidade genética foi inicialmente aplicada ao homem (Harris, 1966) em Drosophila ananassae (Johnson, 1966) e em Drosophila pseudoobscura (Hubby e Lewontin, 1966). Desde então, uma série de trabalhos em diversos organismos vem corroborar os primeiros resultados referentes ao alto grau de variabilidade genética em populações naturais. No gênero Drosophila por exemplo, verifica-se que a proporção de locos polimórficos varia em média de 30 a 50% chegando a alcançar 87% na espécie D. willistoni (Stone e cols, 1968 ;

Prakash, 1969, Prakash e cols, 1969; Lakovaara e Saura, 1971; Richmond, 1972 b, Ayala e cols, 1970, 1972a, 1972b, 1974a; Barker, e Mulley, 1976). A forma pela qual essa alta variabilidade genética é mantida em populações naturais tem sido motivo de discussões e controvérsias. Assim, enquanto alguns autores admitem que ela é mantida por alguma forma de seleção balanceada (Burns, e Johnson, 1971; Lakovaara e Saura, 1971 e cols, 1969; Ayala e cols, 1972a, 1972b, 1974a, Barker e Mulley, 1976) outros admitem que tal polimorfismo é constituído por alelos seletivamente neutros, sendo portanto mantido em populações naturais por jogos do acaso (Kimura, 1968; Kimura e Ohta, 1971; King e Jukes, 1969). Desde então, uma série de trabalhos sobre variabilidade genética estão sendo realizados com objetivo de esclarecer tal problema.

As estimativas da variabilidade genética tem sido utilizadas também na obtenção de informações sobre a divergência genética existente entre indivíduos, populações e espécies. Essas informações são importantes tanto para auxiliar a taxonomia como para elucidar os mecanismos pelos quais ocorre a especiação. Vários autores (Hubby e Throckmorton, 1965, 1968; Nair e cols, 1971 Toledo Fº, 1969; Kanapi e Wheeler, 1970; Toledo Fº e cols, 1976) enfatizam a utilização da eletroforese para auxiliar a taxonomia assim como para estabelecer relações filogenéticas principalmente, quando associada a dados morfológicos, citogenéticos e comportamentais. A detecção de padrões isozimáticos marcadores de espécies torna-se particularmente importante na caracterização dessas espécies quando a análise morfológica é confusa e imprecisa. O desenvolvimento de vários índices de distância e similaridade genética (Hedrick, 1971, Nei, 1972; Rogers, 1972) permitiram a obtenção de fenogramas e possibilitaram um melhor conhecimento sobre os mecanismos relacionados ao processo de especiação.

A especiação segundo autores como Mayr (1963), por exemplo, somente se torna possível após um longo período de isolamento geográfico, quando populações isoladas possam ter sofrido numerosas modificações no genoma. Nesse caso, espécies crípticas, isto é, morfologicamente espécies e isoladas reprodutivamente de vem apresentar o mesmo grau de divergência genética que espécies não crípticas.

Com a utilização da eletroforese em estudos de variabilidade genética autores como Hubby e Throckmorton (1968) e Nair e cols (1971) verificaram que, em Drosophila, o grau de divergência genética entre espécies crípticas é menor do que entre as não crípticas. Esses autores admitem então que a especiação não requer alterações em um grande número de locos.

Outros autores como Ayala e cols (1970, 1974) consideram que a grande diferenciação genética existente entre espécies crípticas a despeito da sua similaridade morfológica é uma evidência de que o processo de especiação depende de uma grande reorganização do conjunto gênico da população. Ayala e cols (1974b) consideram ainda que, em Drosophila willistoni, grande parte da divergência genética ocorre durante os primeiros estágios da especiação, quando populações alopátricas se diferenciam antes de es tarem reprodutivamente isoladas.

Nair e cols (1971) entretanto consideram que dois diferentes mecanismos podem ocorrer na diferenciação de populações: - o primeiro, populações sem isolamento reprodutivo podem apresentar considerável grau de divergência genética, e segundo, populações podem isolar-se reprodutivamente e tornar-se espécies biológicas antes de acumularem grande diferenciação genética.

Bush (1969, 1974, 1975) sugere que o segundo mecanismo

deve ocorrer em espécies de insetos fitófagos do gênero Rhagoletis. Nesses insetos, Bush verificou a existência de raças simpátricas, específicas a determinados hospedeiros ("host - races"). O autor sugere que, nesses organismos, a alteração de alguns locos, como aqueles que controlam seleção para hospedeiro, pode constituir uma excelente barreira ao fluxo gênico entre populações que infestam hospedeiros diferentes. Desse modo, populações podem isolar-se reprodutivamente sem que haja grandes alterações em seu patrimônio genético e sem que ocorra um prévio isolamento geográfico. A detecção de raças desenvolvidas simpátricamente em Rhagoletis tornou questionável o modelo de especiação exclusivamente alopátrico em insetos fitófagos.

Desse modo, estudos de variabilidade genética e diferenciação genética em populações de insetos pragas são extremamente importantes. Se por um lado, a detecção de raças e espécies crípticas são necessárias para que métodos de controle de pragas sejam eficientemente empregados, por outro, fornecem informações valiosas sobre o mecanismo de especiação em insetos fitófagos.

## 1.2. O gênero Silba (Diptera: Lonchaeidae)

Entre os insetos considerados pragas agrícolas, as "moscas-das-frutas" destacam-se pelos elevados prejuízos que causam à fruticultura brasileira. Esses insetos fazem a sua ovoposição nos frutos e as larvas, ao eclodirem, inicia a destruição da polpa desses frutos tornando-os imprestáveis ao consumo.

DeLucchi (1976) considera que os prejuízos causados em todo o mundo por essas moscas são incalculáveis. Os danos variam com a região assim como com as espécies de hospedeiros dispo-

níveis. No Estado de São Paulo, a infestação produz uma redução de 30 a 50% na produção de frutas cítricas (Orlando e Sampaio, 1973). Outras culturas como pêssegos, nêspersas, goiabas e nectarinas são completamente perdidas, se não houver uma prévia proteção dos frutos por ensacamento (Orlando e Sampaio, 1973).

Desde o início do século, os dipteros da família Tephritidae e Lonchaeidae são considerados como as pragas de frutos mais comuns (Hempel, 1906). A família Tephritidae tem sido extensivamente estudada como demonstra as revisões realizadas por Bateman (1972, 1976). Sobre a família Lonchaeidae, existem poucos e esparsos trabalhos havendo, por parte dos autores, discussões e controvérsias sobre as verdadeiras relações desses insetos com seus hospedeiros.

Vários são os trabalhos que associam a ocorrência dos lonqueídeos e tefritídeos em frutos (Costa Lima, 1926; Fonseca e Autuori, 1932 e 1933; Santos, 1954; Silva, 1968). Esse fato sugere que os lonqueídeos constituem pragas de pouca importância pois infestam frutos já atacados por outros insetos, aproveitando-se de puncturas já existentes. Entretanto, autores como Gonçalves (1937) e Blanchard (1948) admitem o caráter primário dos lonqueídeos como pragas devido sua ocorrência em frutos que não apresentaram vestígios de infestação por outros insetos. Korythoyski e Ojeda (1971) sugerem que as espécies do gênero Silba, pelo aspecto rijo do seu ovipositor, podem ter a capacidade de efetuar ataques primários. Autores como Malavasi (1977) e Pavan (1978) admitem que a importância desses insetos deve ser equiparada a dos tefritídeos devido a alta frequência com que infestam principalmente frutos cítricos.

Enquanto que na fruticultura o papel dos lonqueídeos como praga é ainda muito discutido, em mandiccas, esses insetos

são considerados como importantes pragas primárias. Silva (1965) e Gallo e cols (1970) verificaram que a fêmea deposita os ovos nos brotos terminais da mandioca e as larvas, ao eclodirem, penetram nos tecidos do vegetal. Esses autores admitem que em decorrência do ataque pode haver um atraso no desenvolvimento da planta.

A escassez de estudos sobre os lonqueídeos pode ser explicada não por sua controvertida importância como praga, mas pelas dificuldades existentes na identificação das espécies.

A taxonomia dos lonqueídeos da região Neotropical além de incompleta é confusa. Korytkowski e Ojeda (1971) publicaram uma revisão das espécies peruanas citando que dos seis gêneros descritos apenas três estão representados, até o momento, na região Neotropical: Dasiops Rondani, Silba Macquart e Lonchaea Fallen. No Brasil, os três gêneros foram mencionados por Silva e cols (1968). Do gênero Silba, segundo a literatura existente, foi encontrada apenas uma espécie em nosso país, Silba pendula (Bezzi), infestando várias espécies de frutos e brotos terminais de mandioca. A identificação das espécies do gênero Silba torna-se difícil principalmente devido a similaridade da morfologia externa das diversas espécies. Em vista disso, a identificação só pode ser realizada pela análise da genitália. Além disso, a taxonomia desse grupo é incompleta para algumas espécies, como Silba pseudopendula (Korytkowski), na qual apenas o macho foi descrito. Atualmente porém, J. F. Mc Alpine está concluindo uma revisão completa dessa família para a região Neotropical.

### 1.3. Histórico do Projeto

No Laboratório de Genética Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP desenvolvem-se projetos de pesquisa sobre "moscas das-frutas".

Inicialmente esses projetos tinham como objetivo estudos sobre os dípteros da família Tephritidae. Entretanto, com o decorrer dos trabalhos surgiu o interesse de também se estudar os representantes da família Lonchaeidae devido a alta frequência com que esses insetos foram encontrados infestando diversas espécies de frutos. Desse modo, foram desenvolvidos dois subprojetos de estudos sobre os lonqueídeos.

O primeiro subprojeto foi desenvolvido por Maria Cecília Del Vecchio e teve como objetivo principal a sistemática e a dinâmica de infestação das espécies do gênero Silba.

Em 1976, Vecchio iniciou um levantamento dos representantes do gênero Silba que infestavam diversas espécies de frutos e de mandioca (Manihot esculenta). As coletas de frutos infestados foram realizadas em regiões frutícolas do Estado de São Paulo nos municípios de Cordeirópolis, Monte Alegre do Sul e Campinas. Os brotos de mandioca infestados foram coletados apenas nas duas últimas localidades.

A identificação das espécies foi baseada apenas na morfologia da genitália dos machos, devido as dificuldades já citadas. Nesse levantamento foi constatada a existência de dez espécies de Silba infestando frutos e uma só espécie infestando mandioca. Das dez espécies que infestam frutos apenas duas estão descritas: Silba pendula (Bezzi, 1919) e Silba pseudopendula (Korvtkowski, 1971). As demais espécies, inclusive a que infesta mandioca, não

foram descritas.

Os resultados desse trabalho ainda deixaram claro que:

- A espécie que infesta a mandioca parece ser encontrada exclusivamente nesse hospedeiro já que não foi observada em qualquer outro hospedeiro, em nenhuma das localidades analisadas.
- As espécies que infestam frutos possuem diferentes hospedeiros como: café, nêspera, pêsego, laranja, pimenta ...
- Em geral, a mesma espécie de fruto é infestada por mais de uma espécie de *Silba*, embora *S.pseudopendula*, seja a mais frequente.
- Entre as espécies menos frequentes, observou-se a substituição de uma espécie por outra no decorrer do ano.

Para um melhor conhecimento das espécies de *Silba*, encontradas por Vecchio, foi elaborado um segundo subprojeto, cujos objetivos e resultados encontram-se relatados neste trabalho.

#### 1.4. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo o levantamento da variabilidade genética, ao nível enzimático, das espécies do gênero *Silba*. Esse levantamento permite a obtenção de informações sobre: o relacionamento genético entre as espécies do grupo, o grau de diferenciação de populações quanto a preferência por hos

peiro e a existência de padrões marcadores das espécies.

## 2. MATERIAL

Sete espécies de Silba, das onze caracterizadas por Vecchio no Estado de São Paulo, foram analisadas quanto a variabilidade genética de sistemas enzimáticos, por método eletroforético. As demais espécies, durante os dois anos consecutivos de coletas, não foram obtidas em número suficiente, para a análise.

Devido as dificuldades taxonômicas desse grupo de insetos, as espécies estudadas foram provisoriamente designadas por números de 1 a 7, segundo a identificação feita por Vecchio (comunicação pessoal). Duas dessas espécies encontram-se descritas na literatura existente sendo uma delas a espécie 1, Silba pseudopendula (Korytkowski, 1971) e a outra a espécie 7, Silba pendula (Bezzi, 1919).

Dessas sete espécies, seis infestam hospedeiros diferentes, representados pelas diversas espécies de frutos em que foram encontradas. Somente uma espécie, a espécie 4, foi exclusivamente observada em brotos terminais de mandioca (Manihot esculenta G.) (Vecchio, 1977). Os representantes dessas espécies foram portanto, obtidos a partir de frutos e de brotos terminais de mandioca infestados. Os frutos coletados foram: café (Coffea arabica L.), nêspera (Eriobotrya japonica L.) e várias espécies de citros.

As coletas foram realizadas no Estado de São Paulo em Estações Experimentais do Instituto Agrônomo de Campinas. A

escolha dessas estações como locais de coleta, baseou-se no fato delas apresentarem grande variedade de espécies frutíferas, o que permitiu disponibilidade de material durante o ano todo. Os frutos foram coletados na Estação Experimental de Monte Alegre do Sul (Município de Monte Alegre do Sul), na Estação Experimental de Limeira (Município de Cordeirópolis), na Estação Experimental de Jundiaí (Município de Louveira) e no Centro Experimental de Campinas (Município de Campinas). Os brotos de mandioca foram coletados somente no Centro Experimental de Campinas.

Apesar do grande número de frutos coletados, a baixa frequência das espécies 2, 3, 4 e 5 de Silba nos diferentes hospedeiros e em todas as regiões acima mencionadas, não permitiu a análise de um número superior a 50 indivíduos. As espécies 6 e 7 foram ainda mais raras, o que acarretou a análise de um menor número de indivíduos. Os insetos que constituíram a amostra analisada para cada espécie foram obtidos a partir de várias espécies de frutos e de regiões diversas de forma que não foram consideradas as possíveis diferenças regionais e/ou de hospedeiros. Nesse caso, foi avaliada somente a variabilidade existente de cada espécie procurando-se ao mesmo tempo detectar possíveis diferenças interespecíficas.

Para a espécie mais frequente, Silba pseudopendula (espécie 1), analisou-se amostras de populações originárias de regiões e hospedeiros diferentes sendo possível nesse caso, detectar possíveis diversidades genéticas entre amostras de hospedeiros diferentes da mesma localidade e de localidades diferentes. Foram dessa forma, analisadas quatro amostras populacionais dessa espécie, sendo duas originárias de Monte Alegre do Sul e duas de Cordeirópolis. As amostras populacionais de cada região diferiram no sentido de infestarem hospedeiros diversos como café e nêspe-

ra em Monte Alegre do Sul, e café e citros em Cordeirópolis. O café foi escolhido como hospedeiro comum às duas localidades de forma que, possíveis diferenças se detectadas, fossem devidas apenas a diversidade regional.

No quadro I estão relacionadas as amostras populacionais analisadas, seus respectivos hospedeiros, locais e data de coleta, e número mínimo de indivíduos analisados em cada sistema enzimático.

QUADRO 1 - RELAÇÃO DAS AMOSTRAS POPULACIONAIS ANALISADAS

AMOSTRA POPULACIONAL	ESPÉCIE	HOSPEDEIRO	LOCAL DE COLETA *1	DATA DE COLETA MÊS ANO	NÚMERO DE INDIVÍDUOS *2
A	1	café	MA	4 a 6 1976	50
B	1	nêspera	MA	8,9 1977	50
C	1	café	CO	5,6 1976	50
D	1	citros	CO	5,6 1976	50
				5,6 1977	
E	2	citros	CO	8,9 1976	50
				1,2 1977	
		café	CO	4,5 1976	
				5 1977	
F	3	nêspera	MA, LO	8,9 1977	50
		citros	CO	5,6 1977	
G	4	mandioca	CA	10 a 12 1976	50
				1 a 3 1977	

AMOSTRA POPULACIONAL	ESPÉCIE	HOSPEDEIRO	LOCAL DE COLETA <sup>*1</sup>	DATA DE COLETA		NÚMERO DE INDIVÍDUOS <sup>*2</sup>
				MÊS	ANO	
H	5	café	CO, MA	5,6	1977	50
				9	1976	
				8	1977	
I	6	café nêspera citros	CO, MA, CA CA, LO CO	5,6	1977	12
				9,11	1976	
				6	1976	
J	7	café nêspera citros	CO, MA, CA LO CO	5,6	1977	12
				9	1976	
				1,2	1977	

\*<sub>1</sub> - Siglas das Localidades: MA - Monte Alegre do Sul; CO - Cordeirópolis; LO - Louveira; CA - Campinas.

\*<sub>2</sub> - Refere-se ao número mínimo de indivíduos analisados para cada loco.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção dos Insetos em Laboratório

A metodologia utilizada para obtenção de adultos a partir de frutos infestados foi desenvolvida por Souza (comunicação pessoal) e em grande parte, descrita por Malavasi (1977).

No laboratório, os brotos de mandioca e os frutos foram colocados em bandejas de alumínio (40x40x4 cm) sobre uma camada de serragem, previamente umidecida, de aproximadamente 2 cm de espessura. A umidade da serragem foi controlada cuidadosamente porque o seu excesso dificulta a aeração necessária ao desenvolvimento das pupas e favorece o de microorganismos nocivos, e sua falta causa a morte das pupas por desidratação. Para a obtenção destas, as bandejas foram verificadas semanalmente, peneirando-se a serragem. As pupas foram então transportadas para caixas plásticas, de diferentes formas e tamanhos, também contendo serragem úmida, até a emergência dos adultos. Estes foram retirados das caixas, a intervalos de 48 horas, utilizando-se como agente anestésico o dióxido de carbono.

#### 3.2. Preparo e Identificação do Inseto

Todos os insetos antes de serem submetidos a eletroforese foram identificados morfológicamente.

Devido as dificuldades de identificação das espécies do gênero Silba, o reconhecimento das espécies baseou-se na análise da genitália dos machos. Então, para cada inseto procedeu-se a

retirada do abdômem para posterior análise da genitália.

O material a ser analisado eletroforeticamente, cabeça e tórax dos machos de cada espécie, foi mantido em congelador (aproximadamente  $-20^{\circ}\text{C}$ ) até o seu processamento eletroforético. Insetos estocados por mais de dois meses não foram utilizados, pois algumas enzimas desnaturam-se mesmo a essa temperatura.

Os abdomens retirados para análise da genitália foram mantidos em hidróxido de potássio a 10% a frio, por um período de 24 horas. Em seguida, foi feita a dissecação da genitália em álcool 70%, utilizando-se microscópio estereoscópico. As genitálias foram conservadas em tampas plásticas (5 cm de diâmetro) contendo "cellosolve" (etilenoglicol - Merck) segundo técnica de Pires do Prado (comunicação pessoal).

Cada genitália foi então observada ao microscópio e sua identificação feita através de detalhes morfológicos. Os desenhos das genitálias que caracterizam as espécies analisadas neste trabalho, foram gentilmente cedidos por Vecchio e se encontram nas páginas 65 a 71.

### 3.3. Escolha dos Sistemas Enzimáticos

Foi prevista a análise de 13 sistemas enzimáticos, abaixo relacionados com o nome, abreviação e número de identificação segundo a Enzyme Nomenclature ("Commission on Biochemical Nomenclature", 1972).

### I. Hidrolases

1. Esterase (EST) 3.1.1.1.
2. Fosfatase ácida (ACPH) 3.1.3.1.
3. Fosfatase alcalina (APH) 3.1.3.2.
4. Aldolase (ALD) 4.1.2.13.

### II. Desidrogenases

5. Álcool desidrogenase (ADH) 1.1.1.2.
6. Malato desidrogenase NAD dependente (MDH)  
1.1.1.39
7. Malato desidrogenase NADP dependente (ME)  
1.1.1.40
8. Isocitrato desidrogenase (IDH) 1.1.1.42

### III. Desidrogenase acopladas

9. Glutamato-oxalacético transaminase (GOT)  
2.6.1.1.
10. Hexoquinase (HEX) 2.7.1.1.
11. Fosfoglucomutases (PGM) 2.7.5.1.
12. Fumarase (FUM) 4.2.1.2.
13. Glucose fosfato isomerase (PGI) 5.3.1.9.

Cada um desses sistemas enzimáticos foi testado quanto a sua resolução para diferentes tampões, condições de migração e coloração. Em 7 dos 13 sistemas enzimáticos testados conseguiu-se boa resolução.

Para os sistemas glutamato-oxalacético transaminase (GOT) fosfatases ácida e alcalina (ACPH e APH) malato desidrogenases (MDH e ME) não foi obtida qualquer banda ou faixa no gel.

Diante desses resultados preliminares, a análise ficou restrita aos 7 sistemas enzimáticos abaixo relacionados.

1. Esterase
2. Aldolase
3. Isocitrato desidrogenase
4. Fumarase
5. Hexoquinase
6. Glucose fosfato isomerase
7. Fosfoglucomutase

#### 3.4. Eletroforese

O método eletroforético utilizado foi horizontal gel de amido, descrito por Bush e Huettel (1972) e recentemente modificado e descrito por Malavasi (1977).

### 3.4.1. Preparo do Gel

O gel foi preparado com amido hidrolizado (Sigma Chemical Co., Missouri, E.U.A.) a 15,5% em 300 ml de tampão adequado para cada sistema enzimático.

Essa solução foi aquecida em bico de Bunsen, sendo agitada seguidamente até a fervura e o aparecimento de bolhas de ar. Em seguida, essas bolhas foram retiradas da solução por um sistema a vácuo e o gel, ainda quente e líquido, despejado em uma placa de acrílico de 21,5x19,0x2cm. Após o esfriamento em temperatura ambiente, o gel foi recoberto por um plástico fino para evitar evaporação. Cerca de uma hora antes da aplicação das amostras, o gel foi colocado em refrigerador (aproximadamente 5°C).

### 3.4.2. Tampões do Gel

Para os sistemas esterase (EST) e hexoquinase (HEX), o tampão que apresentou melhor resolução foi lítio (modificado de Selander e cols., 1969), constituído pelo tampão A e tampão B. Tampão A: hidróxido de lítio 0,048M e ácido bórico 0,016M pH 8,4 (1,16 gr hidróxido de lítio, 12,36gr ácido bórico e 1000 ml de água destilada. Tampão B: tris 0,078M e ácido cítrico 0,006M pH 8,6. Tampão do Gel: 10% tampão A e 90% tampão B.

Para os sistemas: aldolase (ALD), isocitrato desidrogenase (IDH), fumarase (FUM), glucose fosfato isomerase (PGI) e fosfoglucomutase (PGM), foi utilizado o tampão tris-citrato (Bush e Huettel, 1972); tris 0,076M e ácido cítrico 0,005M pH 8,6 (9,21-

gr de tris, 1,05 gr de ácido cítrico e 1000ml de água destilada.

### 3.4.3. Tampões do Eletrodo

Para os sistemas esterase (EST) e hexoquinase (HEX), foi utilizado o tampão lítio A (modificado de Selander e cols, 1969) já descrito como um dos tampões do gel. Para os demais sistemas enzimáticos utilizou-se o tampão tris-citrato (Bush e Huettel 1972): tris 0,343M e ácido cítrico 0,078M (41,6 gr de tris, 16,44 gr de ácido cítrico e 1000ml de água destilada.

Os tampões do eletrodo foram utilizados uma única vez.

### 3.4.4. Preparo e Aplicação das Amostras

Os homogeneizados dos insetos foram obtidos por trituração. Os insetos foram colocados individualmente, com uma gota de água destilada a (4°C) em cada um dos 20 orifícios (3,5 mm diâmetro / 5 mm profundidade) existentes em uma placa de polietileno. A trituração foi feita inserindo-se nos orifícios um bastão de polietileno, conectado a uma furadeira elétrica funcionando em RPM constante. O homogeneizado foi absorvido por retângulo de papel Whatmann nº 3, de 4 x 9mm.

O gel foi então perfurado transversalmente, com auxílio de régua e espátula, a intervalos regulares (2 mm) e a uma distância sempre constante da ponte catódica (5 cm). Cada retângulo, com o homogeneizado de um inseto, foi inserido verticalmente

em uma das fendas do gel. Foram aplicados 20 retângulos de papel por gel.

#### 3.4.5. Montagem do Equipamento de Eletroforese

O equipamento eletroforético constitui-se de uma placa de acrílico, que contém o gel, sobre duas cubas também de acrílico conectadas a uma fonte de corrente contínua. Essa conexão é feita por eletrodos existentes na tampa superior da cuba, ligados a um fio de platina, imerso no tampão da cuba. Cada cuba conteve 250 ml do tampão de eletrodo.

A placa contendo o gel é colocada sobre as cubas de modo que, a linha de aplicação das amostras fica próxima ao catodo. A ponte entre tampão do eletrodo e gel é feita por meio de uma esponja de celulose (20 x 15cm).

Durante o período de migração o sistema acima descrito com exceção da fonte, é mantido dentro de refrigerador (aproximadamente 5°C).

#### 3.4.6. Corrente elétrica e tempo de migração

Para os dois sistemas de tampões, lítio e tris-citrato, foi mantida uma corrente de 2,5 MA/cm.

A migração desejada, para o sistema lítio, foi de 9,5 cm a partir do ponto de aplicação em direção ao anodo. A linha de frente da migração foi observada pela depressão no gel causada pe

la frente do tampão. A corrente foi interrompida, assim que a migração atingiu a distância desejada.

Para o sistema tris-citrato, o tempo de migração foi de cinco horas, para esse sistema, não foi possível observar a frente da migração.

#### 3.4.7. Corte, Incubação e Fixação do Gel

A placa de acrílico que conteve o gel é constituída de uma placa inteiriça e de duas molduras superpostas a essa placa. Com a retirada das molduras o gel pode ser cortado em três fatias.

O corte foi realizado por um fio de aço bem tensionado montado em um arco de serra. As fatias do gel foram obtidas retirando-se as molduras uma a uma e deslizando-se o fio nos bordos da placa.

Cada fatia assim obtida foi colocada em um recipiente plástico (18 x 9,5 x 2,8 cm) contendo o corante apropriado. A incubação se fez em estufa à 37°C, por um período que variou, de uma a doze horas.

Em seguida, os géis foram fixados em uma solução de 5:5:1 de água, metanol e ácido acético, por um período que também variou, de uma a doze horas.

Após a fixação, o gel foi embrulhado em plástico, analisado, catalogado, e estocado em geladeira.

## A B R E V I A T U R A S

PMS - fenazima metasulfato

NBT - nitroblue tetrazolium

MTT - 3 - (4,5 - tiazol 1,2) 2,5 difenil tetrazolium  
brometo

NAD - nicotinamida adenina nucleotídeo

NADP - nicotinamida adenina nucleotídeo fosfato

ATP - adenosina 5' trifosfato

MDH - desidrogenase málica

G3PD - gliceraldeido 3 fosfato desidrogenase

G6PD - glicose 6 fosfato desidrogenase

FG - fast garnet

### 3.4.8. Coloração

Para o sistema esterase utilizou-se 50 ml de tampão fosfato (Shaw e Koen, 1968); constituído pelo tampão A e B. Tampão A: fosfato de sódio monobásico 0,2M pH= 4,6 (27,8 gr de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   $\text{H}_2\text{O}$  e 1000 ml de água destilada) e Tampão B: fosfato de sódio dibásico 0,2M pH 12,4 (53,65 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 1000 ml de água destilada); Tampão Fosfato - 25 ml tampão A, 5 ml tampão B, 20 ml de água destilada pH - 6,0.

Para os demais sistemas utilizou-se 50 ml de solução tampão tris HCl (Bush e Huettel, 1972). Solução Concentrada: tris HCl 0,4M (48,4 gr de Tris, 8,0 ml HCl e 1000 ml de água destilada).

Solução diluída para coloração: 25 ml de solução concentrada, 75 ml de água destilada.

Abaixo encontram-se relacionados os sistemas enzimáticos com as respectivas fórmulas de coloração utilizadas e referências bibliográficas relativas a cada fórmula descrita.

1. Esterase (EST) (Bush e Huettel, 1972): 7 mg naftil acetato, 20 mg FG e 2,5 ml isopropanol.
2. Aldolase (ALD) (Shaw e Prasad, 1970): 0,5 mg PMS ; 15 mg NBT; 25 g NAD; 50 unidades  $\text{G}_3\text{PD}$ ; 78 g arseniato de sódio; 250 mg frutose 1,6 difosfato de sódio.
3. Isocitrato desidrogenase (IDH) (Bush e Huettel, 1972) 0,5 mg PMS; 10 mg NBT; 10 mg NADP; 50 mg  $\text{MnCl}_2$ , 100 mg ácido isocítrico.

4. Fumarase (FUM) (Bush e Huettel, 1972): 0,5 mg PMS, 10 mg NBT; 35 mg NAD; 100 unidades MDH; 100 mg ácido fumárico.
5. Hexoquinase (HEX) (Shaw e Koen, 1968): 1,5mg PMS, - 3 mg ou 10 mg MTT ou NBT; 12 mg NADP; 12 mg ATP; 40 unidades GÓDP, 10 mg MgCl<sub>2</sub>; 45 mg Glicose.
6. Fosfoglucoase Isomerase (PGI) (Carter e Parr, 1967). 3 mg PMS; 10 mg MTT; 7,5 mg NADP; 12 unidades GÓPD; 50 mg MgCl<sub>2</sub>; 12 mg Frutose 6 fosfato.
7. Fosfoglucomutase (PGM) (Shaw e Koen, 1968): 0,5 mg PMS; 5 mg MTT; 5 mg NADP; 25 unidades G6PD; 100 mg ' glucose 1,6 difosfato de sódio.

### 3.5. Análise e Interpretação dos Géis

Para a interpretação dos géis foi seguida a metodologia descrita por Ayala e cols., (1972b).

Os alelos foram enumerados dependendo da sua ordem de mobilidade em relação ao anodo. O alelo mais lento, ou seja, aquele que migrou menos para o anodo é chamado alelo 1, o seguinte, alelo 2 e assim por diante.

As diversas espécies de Silba foram colocadas no mesmo gel, de modo a evitar diferenças devido à géis, tampões e voltagem. Para um determinado alelo, normalmente o alelo mais comum de S.pseudopendula (espécie 1), foi dado o valor arbitrário 1,00. Para os demais alelos, foi dado um valor baseado na sua distân-

cia de migração do alelo 1,00. Por exemplo, para o sistema PGI, o alelo 1, de S.pseudopendula, que migrou a 1,2 cm recebeu o valor arbitrário 1,00 enquanto que o alelo 2 que migrou a 1,5 cm recebeu o valor de 1,25 (1,5/1,2).

Os resultados assim interpretados para cada indivíduo em cada sistema enzimático foram transcritos para um protocolo.

### 3.6. Análise Estatística

Para cada amostra populacional foram obtidas as frequências relativas genotípicas e gênicas em cada loco enzimático. A partir dessas frequências estimou-se o número de indivíduos heterozigotos esperados para o equilíbrio de Hardy - Weinberg. Foi ainda calculado o intervalo de confiança do número observado de heterozigotos.

As frequências gênicas foram então transformadas em índices de identidade e de distância genética segundo Nei (1972) e Rogers (1972).

Para Nei, a identidade genética entre duas populações A e B quando diversos locos são considerados é dada pela fórmula:

$$I = \frac{JAB}{\sqrt{JAJB}}$$

onde: JA e JB = média aritmética da somatória dos i alelos, nos L locos analisados, na população A e B, respectivamente.

JAB = média aritmética da somatória dos i alelos, nos L lo

cos analisados, na população A e B.

Os valores de I podem variar entre zero (completa diferenciação genética) e um (completa identidade genética).

A distância genética é definida por Nei como:

$$D = - \log_e I$$

Para Rogers, a distância genética entre duas populações é dada pela fórmula:

$$D = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L \frac{1}{2} \sum_{j=1}^{A_i} (P_{ijx} - P_{ijy})^2 \frac{1}{2}$$

onde: L = número de locos

$A_i$  = número de alelos nos i locos

$P_{ijx}$  e  $P_{ijy}$  = frequência dos j alelos da população x e y, respectivamente.

Os valores de D podem variar entre zero (nenhuma diferença genética) e infinito.

A partir da distância genética, segundo Nei, foi obtidos um fenograma pelo método de aglomerados ("Clustering Methods"), segundo Sneath e Sokal (1973).

Os cálculos foram realizados no Centro de Computação Eletrônica da USP pelo sistema B - 6.700. Utilizou-se o programa BIO/NEI para os cálculos dos coeficientes de similaridade e distância genética e o programa BIO/CLUSTER para a obtenção do fenograma por cortesia do Prof. Dr. João S. Morgante.

#### 4. RESULTADOS

Dos sistemas enzimáticos analisados apenas EST é codificada por três locos. Os demais sistemas ALD, HEX, IDH, PGM, PGI e FUM, são codificados por apenas um loco. Portanto no total foram analisados nove locos enzimáticos. Os locos que codificam o sistema EST foram analisados apenas na espécie 4 pois para as demais espécies estudadas os respectivos locos não apresentaram boa resolução. Os locos restantes foram analisados em todas as amostras populacionais.

A tabela 1 apresenta a relação dos sistemas enzimáticos analisados em cada população quanto ao polimorfismo. Dois critérios foram adotados, segundo Ayala e cols (1970), para se definir polimorfismo. Critério de 1% - quando a frequência do alelo mais comum é  $\leq 0,99$ ; critério de 5% - quando a frequência do alelo mais comum é  $\leq 0,95$ .

Apesar de EST ter sido analisada quanto a frequência dos alelos somente na espécie 4, as demais espécies também se apresentaram polimórficas nos vários locos existentes.

Na tabela 2 temos a frequência relativa das populações polimórficas e dos indivíduos heterozigotos para cada loco enzimático. O cálculo da frequência de heterozigotos foi baseado no número esperado para o equilíbrio de Hardy - Weinberg. Por essa tabela observa-se que os sistemas EST e PGM foram polimórficos em todas as populações analisadas enquanto que ALD e HEX foram monomórficas. Os demais sistemas foram polimórficos somente em algumas populações. O locus 2 do sistema EST na espécie 4 foi o que apresentou a mais alta frequência de indivíduos heterozigotos.

A tabela 3 mostra a variação genética apresentada pelas amostras populacionais de Silba. A variabilidade genética foi estimada pela frequência relativa de locos polimórficos por população e pela frequência relativa de indivíduos heterozigotos por loco e por população. Considerando-se as quatro amostras da espécie 1, a amostra D foi a mais polimórfica enquanto que, considerando-se as sete espécies analisadas, o maior polimorfismo foi encontrado na espécie 4. Essa espécie foi também a que apresentou a mais alta frequência de indivíduos heterozigotos por loco.

As tabelas 4 a 10 apresentam o número de indivíduos analisados, as frequências gênicas relativas e a frequência relativa de heterozigotos observada e esperada em cada loco enzimático e em cada amostra populacional. Nessas tabelas se encontram também, para cada loco enzimático, os intervalos de confiança do número observado de heterozigotos em cada amostra populacional. Por essas tabelas observa-se que PGM foi o sistema a apresentar o maior número de alelos em todas as populações analisadas. Os sistemas IDH, PGI e FUM apresentam apenas dois alelos, cuja ocorrência e frequência interespecífica variam de tal modo que foram considerados marcadores, estando agrupados na tabela 11.

Pelos resultados expressos na tabela 11 verifica-se que:

1. Sistema IDH: a espécie 1 foi a única a apresentar dois alelos 1,00 e 1,41. As espécies 2, 3, 4, 5 e 6 somente apresentaram o alelo 1,41 enquanto que, na espécie 7, observou-se somente a ocorrência do alelo 1,00. Pela tabela 7 observa-se que somente a amostra populacional D, das quatro amostras analisadas na espécie

cie 1, apresentou os dois alelos, sendo a frequência do alelo 1,41 muito baixa e nenhum heterozigoto detectado.

2. Sistema PGI: as espécies 4 e 5 possuem os dois alelos 1,00 e 1,25. As espécies 1, 2, 3, e 6 só possuem o alelo 1,00 e a espécie 7, o alelo 1,25. Analisando-se a tabela 9, verifica-se a ocorrência de heterozigotos nas espécies que possuem os dois alelos.

3. Sistema FUM: a espécie 1 foi a única a apresentar os dois alelos 1,00 e 1,40. As espécies 2, 3, 4 e 7 possuem apenas o alelo 1,00 e as espécies 5 e 6, apenas o alelo 1,40.

Na tabela 10 observa-se que apenas duas amostras populacionais, C e D, das quatro analisadas para a espécie 1 possuem os dois alelos. A frequência do alelo 1,40 é muito baixa e nenhum heterozigoto foi detectado.

Pelos resultados da tabela 11 verifica-se que, pelos sistemas IDH, PGI e FUM, a espécie 7 pode ser facilmente separada das demais espécies.

As tabelas 12 a 15 apresentam as matrizes com os coeficientes de similaridade e de distância genética entre as amostras populacionais de Silba. Nas tabelas 12 e 13, as matrizes com os coeficientes de similaridade e de distância genética foram esti-

madras segundo Nei (1972) enquanto que nas tabelas 14 e 15, os coeficientes se baseiam em Rogers (1972). Por essas tabelas observa-se que as espécies mais similares são as espécies 2 e 3 com um índice de 0,9985 (Nei) e de 0,9841 (Rogers) enquanto que, as mais distantes são as espécies 6 e 7 com um índice de 0,7915 (Nei) e de 0,5372 (Rogers). Verifica-se também que, tanto segundo o índice de Nei quanto o de Rogers, o coeficiente de similaridade, das espécies 2 e 3, é maior do que os apresentados por algumas amostras populacionais da espécie 1.

Na tabela 16, os coeficientes de similaridade das amostras populacionais da espécie 1 apresentam-se separados das matrizes. Essa análise foi baseada no índice de Rogers pois em comparação com o de Nei apresentou as maiores diferenças entre as amostras populacionais. Portanto, segundo o índice de Rogers, observamos que todas as amostras populacionais da espécie 1 são entre si, menos similares do que as espécies 2 e 3. As amostras populacionais com o maior coeficiente de similaridade foram a A e C, originárias do mesmo hospedeiro mas de regiões diversas. As amostras populacionais com o menor coeficiente de similaridade, foram a B e D, originárias de hospedeiros diferentes e de regiões diferentes.

Na tabela 17, para cada espécie analisada se encontra a espécie com maior similaridade (maior coeficiente de similaridade) e a espécie com maior distância (maior coeficiente de distância genética). Por essa tabela observa-se que:

1. O maior coeficiente de similaridade é 0,9985 (Nei) e 0,9841 (Rogers) correspondente as espécies 2 e 3. Essas espécies são portanto as mais próximas entre as espécies analisadas.

2. O maior coeficiente de distância é 0,7915 (Nei) e 0,5372 (Rogers) que corresponde as espécies 6 e 7. Portanto, as espécies 6 e 7 são as mais distantes entre todas as espécies analisadas.
3. As espécies 2, 3 e 4, tanto para o índice de Nei como para Rogers, se destacam das demais formando um aglomerado devido a similaridade existente entre elas.
4. As espécies 5 e 6, também para os dois índices (Nei, Rogers), formam o outro aglomerado.
5. A espécie 7 é a espécie mais distante possuindo o maior coeficiente de distância com as espécies 2, 3, 4 e 6, segundo Nei e com as espécies 2, 3, 5 e 6, segundo Rogers.

Todos esses dados são corroborados pelo fenograma das sete espécies que se encontra na

Tabela 1 - Relação dos sistemas enzimáticos analisados quanto ao polimorfismo<sup>1</sup>

AMOSTRA POPULACIONAL	LOCALIDADE	HOSPEDEIROS	ESPÉCIE	EST	ALD	HEX	IDH	PGM	PGI	FUM
A	Monte Alegre	Café	1	P	M	M	M	P <sub>2</sub>	M	M
B	Monte Alegre	Nêspera	1	P	M	M	M	P <sub>2</sub>	M	N
C	Cordeirópolis	Café	1	P	M	M	M	P <sub>2</sub>	M	F <sub>1</sub>
D	Cordeirópolis	Laranja	1	P	M	M	P <sub>2</sub>	P <sub>2</sub>	M	P <sub>2</sub>
E	Cordeirópolis	Laranja	2	P	M	M	M	P <sub>2</sub>	M	M
F	Cordeirópolis	Diversos	3	P	M	M	M	P <sub>2</sub>	M	M
G	Campinas	Mandioca	4	P <sub>2</sub>	M	M	M	P <sub>2</sub>	P <sub>2</sub>	M
H	Diversas	Diversos	5	P	M	M	M	P <sub>2</sub>	P <sub>2</sub>	II
I	Diversas	Diversos	6	P	M	M	M	P <sub>2</sub>	M	II
J	Diversas	Diversos	7	P	M	M	M	P <sub>2</sub>	M	II

1 - M - população monomórfica

P - população polimórfica não analisada quanto a frequência dos alelos

P<sub>1</sub> - população polimórfica pelo critério 1% - frequência do alelo mais comum é 0,99

P<sub>2</sub> - população polimórfica pelo critério 5% - frequência do alelo mais comum é 0,95

Tabela 2 - Frequência relativa de populações polimórficas e de indivíduos heterozigotos por loco

LOCOS	AMOSTRAS PO PULACIONAIS	NÚMERO DE INDIVÍ DUOS ANALISADOS	FREQUÊNCIA RELATIVA DE POPULA- ÇÕES ONDE O LOCO É POLIMÓRFICO		FREQUÊNCIA RELATIVA DE INDIVÍ DUOS HETEROZIGOTOS POR LOCO
			P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	
EST 1	1	50	1,00	1,00	0,490
EST 2	1	50	1,00	1,00	0,570
EST 3	1	50	1,00	1,00	0,240
ALD	10	525	0,00	0,00	0
HEX	10	450	0,00	0,00	0
ILX	10	480	0,00	0,10	0,011
PCM	10	441	1,00	1,00	0,357
PGI	10	486	0,20	0,20	0,100
FUM	10	497	0,10	0,20	0,022

Tabela 3 - Variação Genética em Populações de Silba

AMOSTRA PO- PULACIONAL	LOCALIDADE	HOSPEDEIRO	ESPÉCIE	NÚMERO LOCOS ANALISADOS	NÚMERO ALELOS POR LOCO	FREQUÊNCIA RELATIVA DE LOCOS POLIMÓRFICOS POR POPULAÇÃO P <sub>1</sub>	FREQUÊNCIA RELATIVA DE LOCOS POLIMÓRFICOS POR POPULAÇÃO P <sub>2</sub>	FREQUÊNCIA RELATIVA DE INDIVÍDUOS HETERO- ZIGOTOS POR LOCO POR POPULAÇÃO
A	Monte Alegre	Café	1	6	1,5	0,166	0,166	0,053
B	Monte Alegre	Nêspera	1	6	1,33	0,166	0,166	0,080
C	Cordeirópolis	Café	1	6	1,5	0,166	0,333	0,059
D	Cordeirópolis	Laranja	1	6	1,83	0,500	0,500	0,117
E	Cordeirópolis	Laranja	2	6	1,33	0,166	0,166	0,063
F	Cordeirópolis	Vários	3	6	1,16	0,166	0,166	0,040
G	Campinas	Mandioca	4	9	1,55	0,555	0,555	0,237
H	Diversas	Diversos	5	6	1,5	0,333	0,333	0,120
I	Diversas	Diversos	6	6	1,33	0,166	0,166	0,073
J	Diversas	Diversos	7	6	0,16	0,166	0,166	0,061

Frequência relativa — Média para o gênero Silba

1,41      0,255      0,271

0,090

Frequência relativa média de locos polimórficos para S.pseudopendula: P<sub>1</sub> = 0,250; P<sub>2</sub> = 0,281

Frequência relativa média de indivíduos heterozigotos para S.pseudopendula = 0,077.

Tabela 4 - Frequência relativa dos alelos e heterozigotos dos três locos de EST para a sp 4 (população G) de Silba

LOGO	NÚMERO DE INDIVÍDUOS ANALISADOS		ALELOS		LIMITE		HETEROZIGOTOS		
	0,57	0,84	0,90	1,00	1,60	INFERIOR	OBSERVADO	LIMITE SUPERIOR	ESPERADO
EST 1	50	-	-	0,53	0,47	0,069	0,140	0,261	0,400
EST 2	50	0,14	0,29	-	0,57	-	0,800	0,880	0,570
EST 3	50	-	-	0,14	0,86	-	0,120	0,238	0,210

Tabela 5 - Frequência relativa dos alelos do loco ALD para Silba

AMOSTRA POPULACIONAL	ESPÉCIE	NÚMERO DE INDIVÍDUOS ANALISADOS	-
A	1	70	
B	1	60	
C	1	60	
D	1	60	
E	2	70	todas
F	3	60	monomórficas
G	4	60	
H	5	50	
I	6	15	
J	7	20	

Tabela 6 - Frequência relativa dos alelos do loco HEX para Silba

AMOSTRA POPULACIONAL	ESPÉCIE	NÚMERO DE INDIVÍDUOS ANALISADOS
A	1	70
B	1	50
C	1	50
D	1	50
E	2	50
F	3	50
G	4	50
H	5	50
I	6	12
J	7	18

todas  
monomórficas

Tabela 7 - Frequência relativa dos alelos e heterozigotos do loco IH para Silba

AMOSTRA PO PULACIONAL	ESPÉCIE	NÚMERO DE INDIVÍ DUOS ANALISADOS		ALELOS		LIMITE		HETEROZIGOTOS		ESPERADO
		1,00	1,41	INFERIOR	SUPERIOR	OBSERVADO	LIMITE SUPERIOR			
A	1	70	1,00	-	-	-	-	-	-	-
B	1	50	1,00	-	-	-	-	-	-	-
C	1	50	1,00	-	-	-	-	-	-	-
D	1	50	0,94	0,06	0	0,07	0,11	0	0,07	0,11
E	2	50	-	1,00	-	-	-	-	-	-
F	3	70	-	1,00	-	-	-	-	-	-
G	4	60	-	1,00	-	-	-	-	-	-
H	5	50	-	1,00	-	-	-	-	-	-
I	6	15	-	1,00	-	-	-	-	-	-
J	7	15	1,00	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 8 - Frequência relativa dos alelos e heterozigotos do loco PGM para Silba

AMOSTRA POPULACIONAL	ESPÉCIE	NÚMERO DE INDIVÍDUOS ANALISADOS			ALELOS			HETEROZIGOTOS		
		0,7	1,0	1,1	1,1	1,3	LIMITE INFERIOR	OBSERVADO	LIMITE SUPERIOR	ESPERADO
A	1	50	0,09	0,72	0,16	0,03	0,08	0,16	0,28	0,44
B	1	50	0,01	0,86	0,13	-	0,05	0,12	0,23	0,24
C	1	50	0,09	0,81	0,10	-	0,06	0,14	0,26	0,32
D	1	65	0,10	0,68	0,20	0,02	0,15	0,24	0,36	0,48
E	2	50	0,20	0,76	0,04	-	0,11	0,20	0,33	0,38
F	3	50	0,14	0,85	-	-	0,11	0,20	0,33	0,24
G	4	50	0,14	0,78	0,08	-	0,11	0,20	0,33	0,36
H	5	50	0,09	0,82	0,09	-	0,01	0,28	0,41	0,31
I	6	14	0,07	0,68	0,25	-	0,16	0,35	0,61	0,47
J	7	12	0,25	0,75	-	-	0,0	0,0	0,24	0,37

Tabela 9 - Frequência relativa dos alelos e heterozigotos do loco PGI para Silba

AMOSTRA PO PULACIONAL	ESPÉCIE	NÚMERO DE INDIVÍ DUOS ANALISADOS		ALELOS		LIMITE		HETEROZIGOTOS	
		1,00	1,25	1,25	1,00	INFERIOR	SUPERIOR	OBSERVADO	ESPERADO
A	1	60	1,00	-	-	-	-	-	-
B	1	50	1,00	-	-	-	-	-	-
C	1	50	1,00	-	-	-	-	-	-
D	1	60	1,00	-	-	-	-	-	-
E	2	70	1,00	-	-	-	-	-	-
F	3	50	1,00	-	-	-	-	-	-
G	4	60	0,64	0,36	0,39	0,63	0,51	0,46	
H	5	50	0,70	0,30	0,24	0,49	0,36	0,42	
I	6	18	1,00	-	-	-	-	-	-
J	7	18	-	1,00	-	-	-	-	-

Tabela 10 - Frequência relativa dos alelos e heterozigotos do loco FUM para Silba

AMOSTRA PO PULACIONAL	ESPÉCIE	NÚMERO DE INDIVÍ DUOS ANALISADOS		ALELOS		LIMITE		HETEROZIGOTOS	
		1,00	1,40	INFERIOR	SUPERIOR	OBSERVADO	ESPERADO		
A	1	50	1,00	-	-	-	-	-	-
B	1	50	1,00	-	-	-	-	-	-
C	1	50	0,98	0,02	0	0	0,07	0,0004	0,0004
D	1	80	0,94	0,06	0	0	0,04	0,0390	0,0390
E	2	70	1,00	-	-	-	-	-	-
F	3	50	1,00	-	-	-	-	-	-
G	4	70	1,00	-	-	-	-	-	-
H	5	50	-	1,00	-	-	-	-	-
I	6	15	-	1,00	-	-	-	-	-
J	7	12	1,00	-	-	-	-	-	-

Tabela 11 - Relação dos alelos marcadores das espécies de Silba

ESPÉCIE	L O C O S					
	I D H		P G I		F U M	
	alelo 1,00	alelo 1,41	alelo 1,00	alelo 1,25	alelo 1,00	alelo 1,40
1	+	+	+	-	+	+
2	-	+	+	-	+	-
3	-	+	+	-	+	-
4	-	+	+	+	+	-
5	-	+	+	+	-	+
6	-	+	+	-	-	+
7	+	-	-	+	+	-

Tabela 12 - Coeficiente de similaridade genética (segundo Nei) entre as populações de Silba

ESPÉCIE AMOSTRA	POPULACIONAL	A	1	D	1	C	1	B	3	F	2	E	7	J	4	G	6	I	5	H
1	A	1,0000	0,9990	0,9988	0,9977	0,8190	0,8184	0,8164	0,8184	0,8184	0,8184	0,8184	0,8164	0,8184	0,7886	0,6381	0,6381	0,6381	0,6125	0,6125
1	D		1,0000	0,9973	0,9957	0,8270	0,8275	0,8105	0,8270	0,8270	0,8275	0,8275	0,8105	0,8105	0,7966	0,6671	0,6671	0,6671	0,6391	0,6391
1	C			1,0000	0,9991	0,8231	0,8204	0,8188	0,8231	0,8231	0,8204	0,8204	0,8188	0,8188	0,7913	0,6453	0,6453	0,6453	0,6242	0,6242
1	B				1,0000	0,8234	0,8192	0,8167	0,8234	0,8234	0,8192	0,8192	0,8167	0,8167	0,7921	0,6413	0,6413	0,6413	0,6206	0,6206
3	F					1,0000	0,9985	0,6466	1,0000	1,0000	0,9985	0,9985	0,6466	0,6466	0,9765	0,8142	0,8142	0,8142	0,8020	0,8020
2	E						1,0000	0,6434	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,6434	0,6434	0,9762	0,8149	0,8149	0,8149	0,7982	0,7982
7	J							1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,7378	0,4532	0,4532	0,4532	0,5396	0,5396
4	G														1,0000	0,7853	0,7853	0,7853	0,8074	0,8074
6	I																	1,0000	0,9794	0,9794
5	H																		1,0000	1,0000

Tabela 13 - Coeficiente de distância genética (segundo Nei) entre as populações de Silba

ESPECIE AMOSTRA	POPULACIONAL	1 A	1 D	1 C	1 B	3 F	2 E	7 J	4 G	6 I	5 H
1	A	0,0000	0,0010	0,0012	0,0023	0,1996	0,2004	0,2029	0,2375	0,4493	0,4902
1	D		0,0000	0,0027	0,0043	0,1900	0,1894	0,2101	0,2274	0,4048	0,4977
1	C			0,0000	0,0009	0,1946	0,1980	0,1999	0,2341	0,4381	0,4712
1	B				0,0000	0,1943	0,1994	0,2025	0,2331	0,4443	0,4771
3	F					0,0000	0,0015	0,4361	0,0238	0,2056	0,2206
2	E						0,0000	0,4410	0,0241	0,2047	0,2254
7	J							0,0000	0,3041	0,7915	0,6169
4	G								0,000	0,2417	0,2139
6	I									0,0000	0,0208
5	H										0,0000



Tabela 15 - Coeficiente de distância genética (segundo Rogers) entre as populações de Silba

ESPÉCIE AMOSTRA	POPULACIONAL	1	1	1	1	2	3	4	5	6	7
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
1	A	0,0000	0,0196	0,0166	0,0235	0,1857	0,1926	0,2403	0,3981	0,3457	0,1938
1	B		0,0000	0,0150	0,0419	0,1942	0,1883	0,2456	0,3949	0,3598	0,2013
1	C			0,0000	0,0328	0,1859	0,1844	0,2373	0,3817	0,3535	0,1933
1	D				0,0000	0,1929	0,2021	0,2491	0,3878	0,3239	0,1960
2	E					0,0000	0,0159	0,0687	0,2327	0,1960	0,3417
3	F						0,0000	0,0733	0,2297	0,2039	0,3517
4	G							0,0000	0,1843	0,2513	0,2897
5	H								0,0000	0,0752	0,4732
6	I									0,0000	0,5372
7	J										0,0000

Tabela 16 - Coeficiente de similaridade genética entre as amostras populacionais de S.pseudopendula

AMOSTRA PO PULACIONAL	LOCALIDADE	HOSPEDEIRO	SIMILARIDADE	
			NEI	ROGERS
A	Monte Alegre do Sul	café	0,9977	0,9804
B	Monte Alegre do Sul	nêspera		
C	Cordeirópolis	café	0,9973	0,9672
D	Cordeirópolis	laranja		
A	Monte Alegre do Sul	café	0,9988	0,9834
C	Cordeirópolis	café		
A	Monte Alegre do Sul	café	0,9990	0,9765
D	Cordeirópolis	laranja		
B	Monte Alegre do Sul	nêspera	0,9957	0,9581
D	Cordeirópolis	laranja		

Tabela 17 - Relação das espécies com maior coeficiente de similaridade e de distância genética (segundo Nei e Rogers)

ESPÉCIE	COEFICIENTES DE SIMILARIDADE				COEFICIENTES DE DISTÂNCIA			
	NEI		ROGER		NEI		ROGER	
	SIMILARIDADE	ESPÉCIE	SIMILARIDADE	ESPÉCIE	DISTÂNCIA	ESPÉCIE	DISTÂNCIA	ESPÉCIE
1	0,8275	2	0,8143	2	0,4902	5	0,3981	5
2	0,9985	3	0,9841	3	0,4410	7	0,3417	7
3	0,9985	2	0,9841	2	0,4361	7	0,3517	7
4	0,9765	3	0,9313	2	0,3041	7	0,2491	1
5	0,9794	6	0,9248	6	0,4902	1	0,4732	7
6	0,9794	5	0,9248	5	0,7915	7	0,5372	7
7	0,8188	1	0,8067	1	0,7913	6	0,5372	6

## 5. DISCUSSÃO

- 5.1. A variabilidade genética do gênero Silba. Problemas referentes a detecção de variabilidade isozimática em populações naturais.

A estimativa da variabilidade genética das espécies analisadas, calculada pela frequência relativa de locos polimórficos e de indivíduos heterozigotos por loco, demonstrou que o gênero Silba possui baixa variabilidade quando comparada com a apresentada por outros insetos. As comparações podem ser dificultadas por diversos fatores como:

1. Metodologia utilizada. Na eletroforese, diferenças nos tampões e no material constituinte do gel podem produzir, para o sistema enzimático analisado em um mesmo organismo, diferenças na migração e na separação das bandas isozimáticas. Consequentemente, existe a possibilidade de ocorrerem diferenças entre os resultados de autores diferentes devido a utilização de metodologias diversas. Nesse caso, a comparação da variabilidade genética entre organismos, analisados por autores diferentes que utilizam metodologias diversas torna-se difícil e duvidosa.

2. Sistemas enzimáticos analisados. Sabe-se, pela literatura existente, que sistemas enzimáticos relacionados ao metabolismo da glicose apresentam menor variabilidade do que aqueles que utilizam substratos inespecíficos (Gillespie e Kojima, 1970). Além disso, enzimas regulatórias apresentam um polimorfismo maior do que as não regulatórias (Johnson, 1974). Dessa forma, dependendo do tipo de sistema enzimático analisado pode-se sub ou su-

perestimar a variabilidade genética das populações estudadas. Então, estimativas de variabilidade genética dependem da amostra de locos enzimáticos escolhidos para o estudo e isso deve ser considerado em comparações de variabilidade em trabalhos diferentes (Barker, 1976).

3. Heterogeneidade ambiental. Burns e Johnson (1971); Powell (1971); Gillespie (1973) e vários outros autores sugerem que a heterogeneidade ambiental promove e mantém a variabilidade de genética. Dessa forma, espécies de regiões tropicais devem apresentar maior variabilidade genética do que espécies de regiões temperadas. Richmond (1972a) sugere que a maior variabilidade genética observada em espécies tropicais de Drosophila willistoni quando comparada com a variabilidade de espécies temperadas deve ser o resultado da riqueza dos trópicos em microhabitats. Malavasi (1977) entretanto, comparando a variabilidade genética de espécies tropicais do gênero Anastrepha com a de outros tefritídeos de regiões temperadas encontrou menor variabilidade nas espécies tropicais. O autor discute o problema sugerindo que as populações de insetos dependentes de hospedeiros diferentes, quando a produção de um determinado hospedeiro termina (se desintegram) à procura de novos hospedeiros. Essa desintegração populacional provoca uma oscilação casual nas frequências alélicas com uma conseqüente perda da variabilidade genética.

Assim, se os resultados demonstram que a variabilidade genética das espécies analisadas no presente trabalho é menor do que a apresentada por outros insetos, essa comparação só pode ser realizada considerando-se esses fatos.

Além dos problemas relacionados com a metodologia, no gênero Silba, foi analisado apenas um sistema enzimático que utili

za substrato variável. O sistema EST de fato, apresentou um polimorfismo tão alto que a análise das frequências gênicas só foi possível na espécie 4, que apresentou menor número de bandas isozimáticas e melhor resolução. Os demais sistemas enzimáticos estudados são ligados ao metabolismo da glicose e realmente apresentaram menor variabilidade. Entre os sistemas glicolíticos analisados, os regulatórios mostraram-se mais polimórficos do que os não regulatórios. A análise de um maior número de sistemas enzimáticos que utilizam substratos inespecíficos e de sistemas enzimáticos glicolíticos regulatórios provavelmente resultaria na detecção de maior variabilidade nas espécies desse gênero.

Outro aspecto a ser considerado no presente trabalho, refere-se ao número de indivíduos analisados em cada população. Apesar do grande número de coletas, a obtenção dos indivíduos de cada espécie foi difícil, o que nos sugere uma baixa densidade populacional dessas espécies. Entretanto, quanto a esse fato, deve ser considerado que Silba é um gênero constituído por espécies nativas (Malavasi, 1977; Pavan, 1978) e provavelmente, o repositório natural dessas espécies é constituído por hospedeiros silvestres. Indivíduos dessas populações devem ter invadido os novos nichos representados por frutos comerciais introduzidos formando então pequenas populações locais. Nesse caso, a variabilidade genética dessas populações pode representar apenas uma pequena parcela daquela existente nas populações nativas originais. Além disso, nas espécies de Silba, assim como nas de Anastrepha, também deve ocorrer o fenômeno de desintegração populacional ao fim da safra dos frutos com uma perda de variabilidade.

A maior variabilidade foi observada nas populações C e D pertencentes à espécie 1, ambas originárias da mesma região, mas infestantes de hospedeiros diferentes e nas espécies 4 e 5. O

polimorfismo encontrado na população D da espécie 1 foi ainda maior que o observado na espécie 4 pois, nesta espécie, foram considerados os resultados obtidos com a análise do EST que é um sistema altamente polimórfico.

Algumas populações de Silba, para alguns dos sistemas enzimáticos analisados, apresentaram desvios quanto a frequência relativa de heterozigotos observada e a esperada por Hardy — Weinberg. Os desvios foram testados pelo intervalo de confiança dos valores observados devido a impossibilidade de aplicação do qui-quadrado. Esses desvios foram provocados principalmente por deficiência e ausência de heterozigotos. Deficiência de heterozigotos foi observada no sistema EST para a espécie 4, que foi a única analisada, e no sistema PGM em todas as espécies com exceção das espécies 3, 5 e 6. Ausência de heterozigotos foi verificada no sistema IDH e FUM em todas as populações, da espécie 1, que apresentaram mais de um alelo.

A ausência de heterozigotos nos sistemas IDH e FUM poderia ser explicada por herança ligada ao sexo. Nesse caso, heterozigotos somente poderiam ser detectados se as fêmeas de cada espécie também fossem incluídas na análise. Além disso, na espécie 1, os locos que codificam esses sistemas apresentam um dos alelos em uma frequência tão baixa que pode ser considerado como alelo raro. Para o sistema IDH, o alelo raro foi fixado nas espécies 2, 3, 4, 5 e 6 e não foi detectado na espécie 7. Para o sistema FUM, o alelo raro fixou-se nas espécies 5 e 6 não tendo sido observado nas demais espécies. Esses resultados parecem portanto sugerir que esses alelos, na espécie 1, estão sendo eliminados. Essa eliminação alélica poderia ser explicada também por um tipo de seleção contra heterozigotos.

Deficiência de heterozigotos foi também observada em vários outros insetos por vários autores (Stone e cols, 1968; Johnson, 1969; Burns, 1971; Narang, 1971; Rockwood e cols, 1973, e Barker e Mulley, 1976). Barker e Mulley sugerem três mecanismos que poderiam determinar deficiências de heterozigotos em populações naturais. O primeiro deles é o efeito Wahlund, segundo o qual, a amostra retirada de uma localidade pode incluir indivíduos de populações diferentes com diferentes frequências gênicas. As diferenças nas frequências gênicas seriam devidas a oscilação genética, existente em populações pequenas e parcialmente isoladas ou ainda devidas a seleção diferencial nas diferentes populações. O segundo mecanismo seria a ocorrência de endocruzamentos por gerações sucessivas em populações de tamanho pequeno. O terceiro mecanismo seria seleção diversificadora em populações sujeitas a múltiplos nichos.

O endocruzamento deve ocorrer nas populações das espécies de Silba são pequenas e locais. A seleção diversificadora deve estar atuando já que os indivíduos de uma mesma espécie podem explorar nichos diferentes representados pelos diferentes hospedeiros. Além disso, a amostra retirada de cada localidade compreendeu indivíduos pertencentes a populações que infestam hospedeiros diferentes e portanto com diferentes frequências gênicas decorrentes de oscilação e seleção diversificadora.

Em resumo, podemos dizer que a variabilidade genética apresentada pelo gênero Silba, assim como a detectada para a Anastrepha, foi pequena em relação a outros insetos. Entretanto essa comparação de variabilidade genética de insetos diferentes analisados por autores diferentes deve ser realizada com cuidado.

Os dados referentes à densidade e a flutuação populacio-

nal dessas espécies (Vecchio, comunicação pessoal) foram essenciais para a interpretação de nossos resultados. A análise de um maior número de sistemas enzimáticos em populações que infestam também hospedeiros silvestres se faz necessária para uma estimativa melhor da variabilidade genética desse gênero.

#### 5.2. Afinidades genéticas interpopulacionais da espécie S.pseudopendula

A evolução, como salienta Lewontin (1967), ocorre pela conversão da variação genética dentro de uma população em variação genética entre populações, no espaço (formação de raças e espécies) e no tempo (evolução filética). Desse modo, estimativas da variabilidade genética assim como da divergência genética entre populações de uma mesma espécie são essenciais para se entender fenômenos evolutivos.

Em S.pseudopendula, foi possível a análise da variabilidade genética em quatro amostras populacionais originárias de hospedeiros e regiões diferentes.

Das quatro populações, a mais polimórfica foi a população D originária de Cordeirópolis e infestante de citros. Apesar de existir divergência genética entre as quatro populações observou-se que, para todos os locos analisados, o mesmo alelo é sempre mais frequente em todas as populações.

Essa uniformidade das frequências gênicas face a ambientes heterogêneos foi também encontrada em outros insetos por vários autores (Burns e Johnson, 1971; Prakash e cols, 1969; Lakovaara e Saura, 1971; Ayala e cols, 1972a, 1972b, 1974a) e tem

sido considerada uma prova em favor da hipótese de que as isozi-  
mas são mantidas por alguma forma de seleção balanceada. Pela  
hipótese da neutralidade seletiva, as frequências gênicas não de-  
veriam ser uniformes em populações geograficamente isoladas. Ki-  
mura e Ohta (1971) salientam entretanto que em organismos de gran-  
de mobilidade nenhuma população é suficientemente isolada tendo  
a migração um importante papel em uniformizar as frequências gê-  
nicas.

Entretanto, autores como Ayala e cols (1974a) e Rockwood  
e cols (1971) Prakash (1969) encontraram para espécies de Droso-  
phila, que são reprodutivamente isoladas, similaridade das fre-  
quências alélicas em vários locos e que portanto não pode ser ex-  
plicada por fluxo gênico. Em Silba, foi também observada unifor-  
midade de frequências alélicas para os locos PGI e PGM em espé-  
cies diferentes. Pela hipótese da neutralidade seletiva dos ale-  
los, não podendo ser considerado o efeito da migração, esperar -  
se-ia sempre encontrar diferentes frequências em espécies dife-  
rentes.

Esse problema continua a ser discutido pelos vários auto-  
res e a sua resolução, como bem salienta Lewontin (1973), depen-  
derá do acúmulo de provas do valor seletivo dos alelos em cada  
caso estudado.

As estimativas da divergência genética entre as quatro  
amostras populacionais foram obtidas utilizando-se os índices de  
Nei e Rogers. Pelo índice de Rogers, os resultados sugerem que  
deve estar havendo uma tendência dessas populações em diferenci-  
ar-se pela preferência por hospedeiro. As populações originárias  
da mesma espécie de hospedeiro e de localidades diversas apresen-  
tam maior grau de similaridade que populações infestantes de hos-  
pedeiros diferentes da mesma localidade.

Entretanto, autores como Malavasi (1977) sugerem que em espécies, como as do gênero Silba, que se caracterizam por ausência de diapausa e que possuem grande disponibilidade de hospedeiros, as populações dificilmente desenvolveriam raças específicas de hospedeiros já que essas populações possuiriam um menor valor adaptativo do que aquelas que exploram diversos hospedeiros.

Como os resultados encontrados pelo índice de Rogers não foram corroborados pelo índice de Nei torna-se necessário a análise de um maior número de sistemas enzimáticos o que possibilitará uma resposta mais segura ao problema.

### 5.3. Afinidades genéticas interespecíficas do gênero Silba

As comparações genéticas interespecíficas, como salientam Selander e Johnson (1973), podem fornecer uma ampla variação isto porque a divergência genética reflete tanto a quantidade de modificação genética que acompanhou a especiação como aquela que se acumulou após esse processo.

As comparações genéticas entre as sete espécies de Silba utilizando-se os índices de similaridade e de distância genética de Nei e Rogers, demonstram um baixo grau de divergência genética. Essas espécies são portanto muito próximas estando ainda em início de diferenciação. A análise morfológica desses insetos corrobora o fato acima exposto pois as sete espécies são distinguíveis apenas por pequenas diferenças na genitália.

Eletroforeticamente porém, a espécie 7 foi a que se apresentou mais distante das demais espécies. As espécies 2 e 3 fo-

ram as mais próximas entre si. Essas espécies apresentaram um grau de similaridade ainda maior que o existente entre as populações da espécie 1, considerando-se o índice de Rogers.

Esses resultados parecem sugerir que o processo de especiação no gênero Silba não deve ter envolvido grandes alterações nos locos analisados. Entretanto, deve ser ressaltado que a divergência genética que ocorre durante a especiação deve envolver também modificações nos mecanismos gênicos regulatórios que não são detectáveis por eletroforese (Nair e cols, 1971).

A metodologia eletroforética mostrou-se útil como auxiliar para a taxonomia desse grupo pois a existência de padrões isozimáticos marcadores possibilitou uma melhor caracterização de cada espécie. Os sistemas IDH e PGI são marcadores da espécie 7 possibilitando a sua distinção das demais espécies analisadas. O sistema FUM também se apresentou um ótimo marcador das espécies 5 e 6. Quanto as demais espécies, se reunidas em grupos de duas ou três espécies, os três sistemas marcadores possibilitam a distinção de cada uma.

A utilização da eletroforese como auxiliar da taxonomia do gênero Silba torna-se essencial devido as já citadas dificuldades na identificação das espécies. Além disso, a existência de padrões isozimáticos marcadores possibilita a identificação das fêmeas de cada espécie para posterior análise morfológica.

A orientação de novos estudos sobre a variabilidade genética nesse grupo de insetos, vista sob o ângulo deste trabalho, irá requerer no futuro a análise de um maior número de sistemas enzimáticos assim como a análise de populações que infestam hospedeiros silvestres.

## 6. CONCLUSÕES E SUMÁRIO

Sete espécies do gênero Silba foram analisadas quanto a variabilidade genética, ao nível enzimático, pelo método eletroforético horizontal em gel de amido. O levantamento dessa variabilidade possibilitou estabelecer afinidades genéticas entre as espécies, detectar marcadores genéticos para auxiliar a taxonomia e obter informações sobre as estratégias evolutivas das espécies desse gênero.

As amostras foram constituídas pela cabeça e tórax de insetos adultos obtidos de brotos terminais de mandioca (Manihot esculenta) e várias espécies de frutos comerciais infestados. O abdômem dos insetos não foi analisado eletroforeticamente pois foi retirado para a identificação das espécies que só é possível pela análise morfológica da genitália dos machos.

Na espécie 1, Silba pseudopendula, foram analisadas quatro amostras, de cinquenta indivíduos por amostra, que representam populações originárias de hospedeiros diferentes da mesma localidade e de mesmo hospedeiro de localidades diferentes. Para as demais espécies só foi possível a análise de uma única amostra que compreendeu indivíduos originários de diferentes espécies de hospedeiros de regiões diferentes. Assim, nas espécies 2, 3, 4 e 5 analisou-se uma amostra de cinquenta indivíduos e nas espécies 6 e 7 de frequência muito rara a amostra foi de doze indivíduos.

Os sistemas enzimáticos analisados foram: esterase (EST), aldolase (ALD), hexoquinase (HEX), isocitrato desidrogenase (IDH), fosfoglucoose isomerase (PGI), fosfoglucomutase (PGM) e fumarase (FUM). Os resultados obtidos com a análise de cada espécie foram comparados utilizando-se os índices de similaridade e distância genética de Nei (1972) e Rogers (1972). Os índices de distância genética segundo Nei foram utilizados na obtenção de um fenograma pelo método de aglomerados.

Os resultados mostraram que a variabilidade genética encontrada para as espécies de Silba é menor do que a existente em outras espécies de insetos. Os sistemas enzimáticos relacionados com o metabolismo da glicose apresentaram menor variabilidade que os não-glicolíticos. O sistema EST apresentou diversos locos, em todas as espécies sendo que na espécie 4 três locos foram analisados. Os outros sistemas apresentaram um único loco.

Para todas as populações analisadas, os sistemas EST e PGM foram polimórficos enquanto que ALD e HEX foram monomórficos. Os sistemas IDH, PGI e FUM foram considerados como marcadores genéticos pois permitiram a distinção da espécie 7 das outras espécies analisadas. A existência de marcadores genéticos faz da eletroforese um método útil para auxiliar a taxonomia. Esses sistemas marcadores permitem a identificação das fêmeas de cada espécie para uma posterior análise morfológica. Esses resultados são de importância fundamental se nós considerarmos que a taxonomia da família Lonchaeidae é difícil e incompleta.

Os resultados, analisados pelo índice de Rogers, sugerem que deve estar havendo uma diferenciação das populações quanto a preferência por hospedeiro. As espécies 2 e 3 exibiram o mais alto grau de similaridade genética e as espécies 6 e 7 a mais al

ta distância genética. As comparações interespecíficas mostraram que as espécies analisadas são muito próximas estando ainda em início de diferenciação. Esse fato sugere que o mecanismo de especiação nesse gênero não deve envolver grandes alterações em genes estruturais.

## 7. CONCLUSIONS AND SUMMARY

The genetic variability of seven different species of the genus Silba has been analyzed by the electrophoretic method using isozymes on a horizontal starch gel system. An analysis of the variability was done to determine genetic species similarities, obtain information on the speciating mechanism and detect genetic markers for species identification.

Four samples, 50 individuals per sample, of Silba pseudo pendula, designated as species number 1, were analyzed. These samples represent populations collected from different hosts but the same locality, and from the same host but different localities. For other species a single sample was analyzed including individuals collected from different species of hosts from several regions. In species number 2, 3, 4 and 5 a sample of 50 individuals was analyzed for each species while in species number 6 and 7 only 12 individuals were analyzed for each species.

The samples were obtained by collecting larvae from terminal buds of cassave plants (Manihot esculenta L.) and rearing them to adults before mascerating them for analysis. The abdomen of male flies was not used in the electrophoretic samples because it was separated for morphological analysis of the genitalia used in species identification.

The isozyme systems used were: esterase (EST), aldolase (ALD), hexokinase (HEX), isocitrate dehydrogenase (IDH), fumarase (FUM), phospho-glucomutase (PGM), and phosphoglucoisomerase

(PGI). The results for each species were compared using the similarity and genetic distance indexes from Nei (1972) and Rogers (1972). The genetic distance indexes (Nei 1972) were used in the elaboration of a phylogenetic dendrogram by the cluster method.

The results showed that the genetic variability found among Silba spp. is less than that among other species of insects. The esterase system presented several loci and in species 4 three loci were found. The other system presented a single locus.

For all the analyzed populations, EST and PGM systems were polymorphic while ALD and HEX systems were monomorphic. The IDH, FUM and PGI systems were considered as genetic markers and enable the distinction of species number 7 from the other analyzed species. The existence of genetic markers in the isozyme systems makes it a very useful method in studying taxonomy. These systems allow the identification of females of each species by a posterior morphological description. These results are of importance if we consider that the taxonomy of the Lonchaeidae family is difficult and incomplete.

The results, analyzed by the Rogers index, suggested an interpopulational genetic drift tending to generate host races. Species number 2 and 3 exhibited the highest similarity index and species number 6 and 7 the highest genetic distance index according to the two different indexes analysed (Nei 1972, Rogers 1972). The interspecific comparisons showed that the analyzed species are very closely related which would suggest a speciation mechanism involving a very low degree of alteration of the gene loci analyzed.

## 8. BIBLIOGRAFIA

AYALA, F.J.; MOURÃO, C.A.; PÉREZ-SALAS, S.; RICHMOND, R.; DOB-ZHANSKI, T. Enzyme variability in the Drosophila willistoni group I - Genetic differentiation among sibling species. Proc. Nat. Acad. Sci USA, 67:225-232, 1970.

AYALA, F.J.; POWELL, J.R.; TRACEY, M.L.; MOURÃO, C.A.; PÉREZ-SALAS, S. Enzyme variability in the Drosophila willistoni group IV - Genic variation in natural populations of D. willistoni. Genetics, 70:113-139, 1972a.

AYALA, F.J.; POWELL, J.R.; TRACEY, M.L. Enzyme variability in the Drosophila willistoni group V - Genic variation in natural populations of Drosophila equinoxialis. Genet. Res., 20:19-42 1972b.

AYALA, F.J.; TRACEY, M.L.; BARR, L.G.; MC DONALD, J.F.; PÉREZ-SALAS, S. Genetic variation in natural populations of five Drosophila species and hypothesis of the selective neutrality of protein polymorphism. Genetics, 77(2):343-384, 1974a.

AYALA, F.J.; TRACEY, M.L.; HEDGECOCK, D.; RICHMOND, R.C. Genetic differentiation during the speciation process in Drosophila. Evolution, 28:576-592, 1974b.

- AYALA, F.J.; TRACEY, M.L.; LOUAINÉ, G.B.; EHRENFELD, J.G. Genetic and reproductive differentiation of the subspecies Drosophila equinoxialis caribbensis. Evolution, 28(1):25-41, 1974c.
- BARKER, J.S.F.; MULLEY, J.C. Isozyme variation in natural populations of Drosophila buzzatii. Evolution, 30:213-233, 1976.
- BATEMAN, M.A. The ecology of fruit flies. Ann.Rev. Entomol., 17:493-518, 1972.
- BATEMAN, M.A. Gruit flies - IN: De LUCHI, V.L. ed., Studies in Biological Control. Cambridge University Press, 1976, p.11-49.
- BEZZI, M. Two new ethiopian Lonchaeidae, with notes on other species (Dipt.). Bull Entomol-Res., 9(3):241-254, 1918.
- BURNS, J.M.; JOHNSON, F.M. Esterase polymorphism in natural populations of a sulfur butterfly, Colias eurytheme. Science, 156:93-96, 1967.
- BURNS, J.M.; JOHNSON, F.M. Esterase polymorphism in the butterfly Hemiargus isola. Stability in a variable environment. Proc. Nat. Acad. Sc. USA, 68(1):34-37, 1971.
- BUSH, G.L. Sympatric host race formation and speciation in frugivorous flies of the genus Rhagoletis. Evolution, 23:237-254, 1969.

- BUSH, G.L. The mechanism of sympatric host race formation in the true fruit flies (Tephritidae). IN: WHITE, M.J.D., ed. , Genetic Mechanisms of Speciation in Insects. Sidney Australia e New Zealand Book, 1974, p.3-23.
- BUSH, G.L. Modes of animal speciation. Ann. Rev. Ecol. Syst., 6:339-364, 1975.
- BUSCH, G.L.; HUETTEL, R.N. Starch gel electrophoresis of tephritid proteins. International Biological Programme, ed. 1972.
- CARTER, N.D.; PARR, C.W. Isoenzymes of phosphoglucose isomerase in mice. Nature, 216:511, 1967.
- CLARK, L.R.; GEIER, P.N.; HEEGHES, R.D.; MORRIS, R.F. The ecology of insect populations in theory and practice. London, Methuen, 1967.
- COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE. Enzyme nomenclature. Amsterdam, Elsevier Scientific Pub. Co., 1972.
- COSTA-LIMA, A. Sobre as moscas das frutas que vivem no Brasil. Chãcaras e Quintais, 34:21-24, 1926.
- DeLUCHI, V.L. Studies in Biological Control. Cambridge, Cambridge University Press, 1976.

- DOBZHANSKI, T. Genética do Processo Evolutivo. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo e Editora Polígono, 1970.
- FONSECA, J.P.; AUTUORI, M. Lista dos principais insetos que atacam plantas cítricas no Brasil. Rev. Entomol., 2(2):202 - 216, 1932.
- FONSECA, J.P.; AUTUORI, M. Pragas dos Citrus. In Manual de Citricultura. Vol. 2. Edição de Chácaras e Quintais. São Paulo, 1933.
- GILLESPIE, J.H. Polymorphism in random environments. Theoret. Pop. Biol., 4:193-195, 1973.
- GILLESPIE, J.H.; KOKIMA, F. The degree of polymorphisms in enzymes involved in energy productions compared to that in nonspecific enzymes in two Drosophila ananassae populations. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 61:582-585, 1968.
- HARRIS, H. Enzyme polymorphisms in man. Proc. Roy. Soc. B., 164:298-310, 1966.
- HEDRICK, P.W. A new approach to measuring genetic similarity. Evolution, 25:276-280, 1971.
- HEMPEL, A. O bicho dos frutos e seus parasitas. Biol. Agricult., 7:206-214, 1906.

- HUBBY, J.L.; LEWONTIN, R.C. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. 1. The number of alleles at different loci in Drosophila pseudoobscura. Genetics, 54:577-594, 1966.
- HUBBY, J.L.; THROCKMORTON, L.H. Protein differences in Drosophila II - Comparative species genetics and evolutionary problems. Genetics, 52:203-215, 1965.
- HUBBY, J.L.; THROCKMORTON, L.H. Protein differences in Drosophila IV - A study of sibling species. Am.Nat., 102:193-205, 1968.
- HUNTER, R.L.; MARKERT, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. Science, 125:1294-1295, 1957.
- JOHNSON, F.M.; KANAPI, C.G.; RICHARDSON, R.H.; WHEELER, M.R. ; STONE, W.S. An Analysis of polymorphisms among isozyme loci in dark and light Drosophila ananassae strains from America and Western Samoa. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 56:119-125, 1966.
- JOHNSON, F.M.; SCHAFFER, H.E.; GILLASPY, J.E.; ROCHWOOD, F.S. Isozyme genotype - environment relationships in natural populations of the harvester ant, Pogonomyrmex barbatus from Texas. Biochem. Genet., 3:429-450, 1969.
- JOHNSON, G.B. Enzyme polymorphism and metabolism. Science, 184:28-37, 1974.

- KANAPI, C.G.; WHEELER, M.R. Comparative isozyme patterns in three species of the Drosophila nasuta complex. Texas Rep. Biol. Med., 28(3):261-278, 1970.
- KIMURA, M. Genetic variability maintained in a finite population due to mutational production of neutral and nearly neutral - isoalleles. Genet. Res., 11:247-269, 1968.
- KIMURA, M.; OHTA, T. Protein polymorphism as a phase of molecular evolution. Nature. 229:467-469, 1971.
- KING, J.L.; JUKES, T.H. Non-Darwinian evolution. Science, 164:788-798, 1969.
- KORYTKOWSKI, C.A.; OJEDA, D. Revision de las especies de la familia Lonchaeidae en el Peru (Diptera: Acalyphatae). Rev. Per. Entom., 14(1):87-116, 1971.
- LAKOVAARA, S.; SAURA, A. Genetic variation in natural populations of Drosophila obscura. Genetics, 69:377-384, 1971.
- LEWONTIN, R.C. Population Genetics. Ann. Rev. Genet., 1:37-70 1967.
- LEWONTIN, R.C. Population Genetics. Ann. Rev. Genet., 7:1-17, 1973.
- LEWONTIN, R.C.; HUBBY, J.L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural population.  
2 - Amount of variation and degree of heterozygosity in

- natural populations of Drosophila pseudoobscura. Genetics ,  
54:595-609, 1966.
- MALAVASI, A. Aspectos da biologia populacional e genética de  
Anastrepha (Diptera: Tephritidas). Tese de Doutorado. Insti-  
tuto de Biociências. Universidade de São Paulo. S.P., 1977.
- MARKERT, C.L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue,  
ontogenetic, and species specific patterns. Proc. Nat. Acad.  
Sci. USA, 45(5):753-763, 1959.
- MAYR, E. Animal species and Evolution. Cambridge, Mass.,  
Belknap Press of Harvard University Press, 1963.
- NAIR, P.S.; BRNCIC, D.; KOJIMA, K. Isozyme variations and  
evolutionary relationships in the mesophragmatica species  
group of Drosophila. Univ. Texas Publ., 7103:15-28, 1971.
- NARANG, S.; KITZMILLER, J.B. Esterase polymorphism in a natural  
population of Anopheles punctipennis II Analysis of the Est-C-  
system. Can. J. Genet. Cytol., 13:771-776, 1971.
- NEI, M. Genetic distance between populations. Am. Nat., 106(949)  
:283-292, 1972.
- NEVO, E.; KIM, Y.J.; SHAW, C.R.; THAELER, C.S. Genetic variation  
selection and speciation in Thomomys talpoides pocket gophers.  
Evolution, 28(1):1-23, 1974.

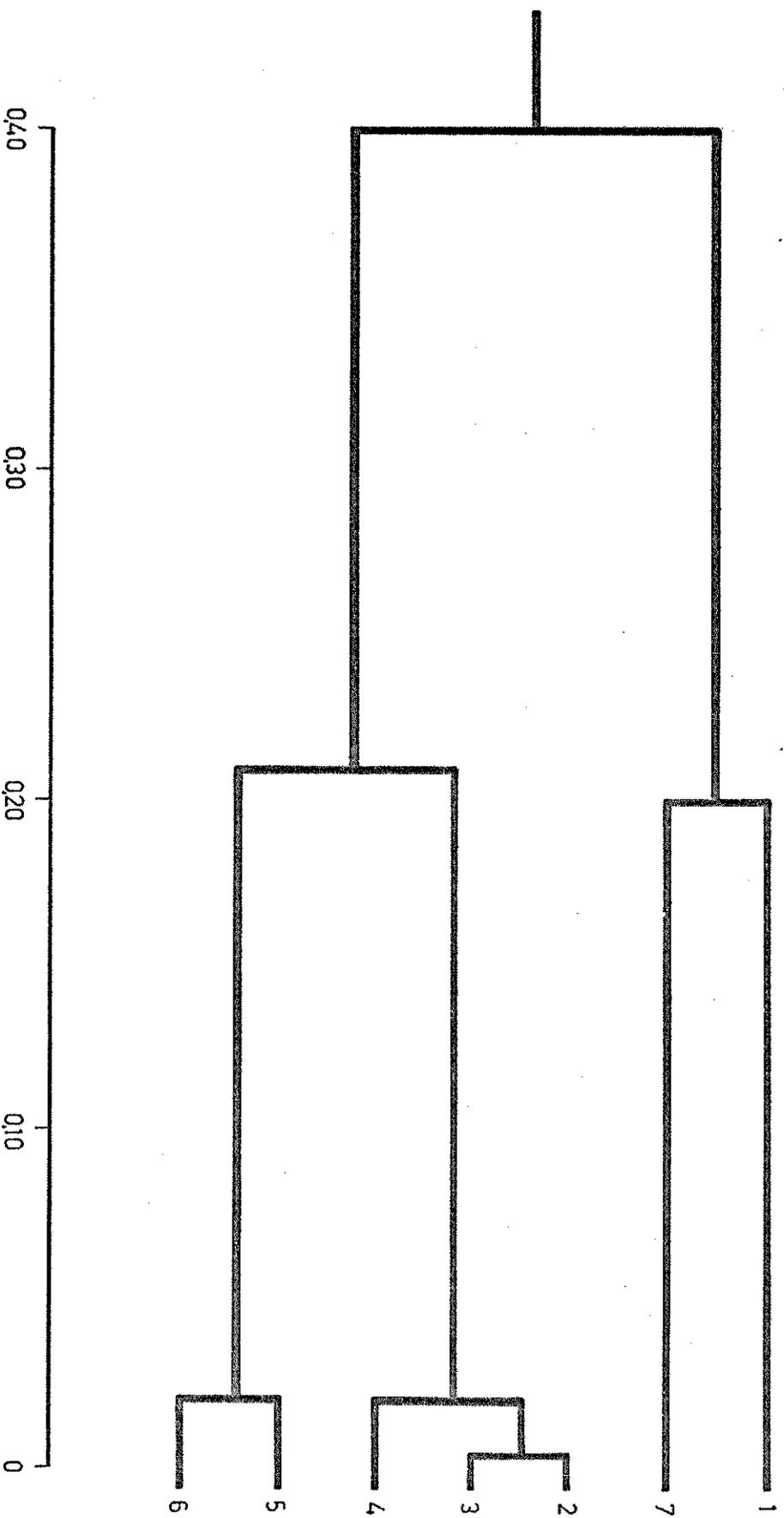
- ORLANDO, A.; SAMPAIO, A.S. Moscas das frutas. O Biológico, 39:143-150, 1973.
- PAVAN, O.H.O. Estudos populacionais de moscas-de-frutas (Diptera: Tephritidae e Lonchaeidae). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, SP, 1978.
- POWELL, J.R. Genetic polymorphisms in varied environments. Science, 174:1035-1036, 1971.
- PRAKASH, S. Genic variation in a natural population of Drosophila persimilis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 62:778-784, 1969.
- PRAKASH, S.; LEWONTIN, R.C.; HUBBY, J.L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations IV Patterns of genic variation in central marginal and isolated populations of D. pseudoobscura. Genetics, 61:841-858, 1969b.
- RICHMOND, R.C. Genetic similarities and evolutionary relationships among the semispecies of Drosophila paulistorum. Evolution 26:536-544, 1972a.
- RICHMOND, R.C. Enzyme variability in the Drosophila willistoni group. II Amounts of variability in the superspecies D. paulistorum. Genetics, 70:87-112, 1972b.
- ROCKWOOD-SLUSS, E.S.; JOHNSTON, J.S.; HEED, W.B. Allozyme genotype-environment relationships. I - Variation in natural populations of Drosophila pachea. Genetics, 73:135-146, 1973.

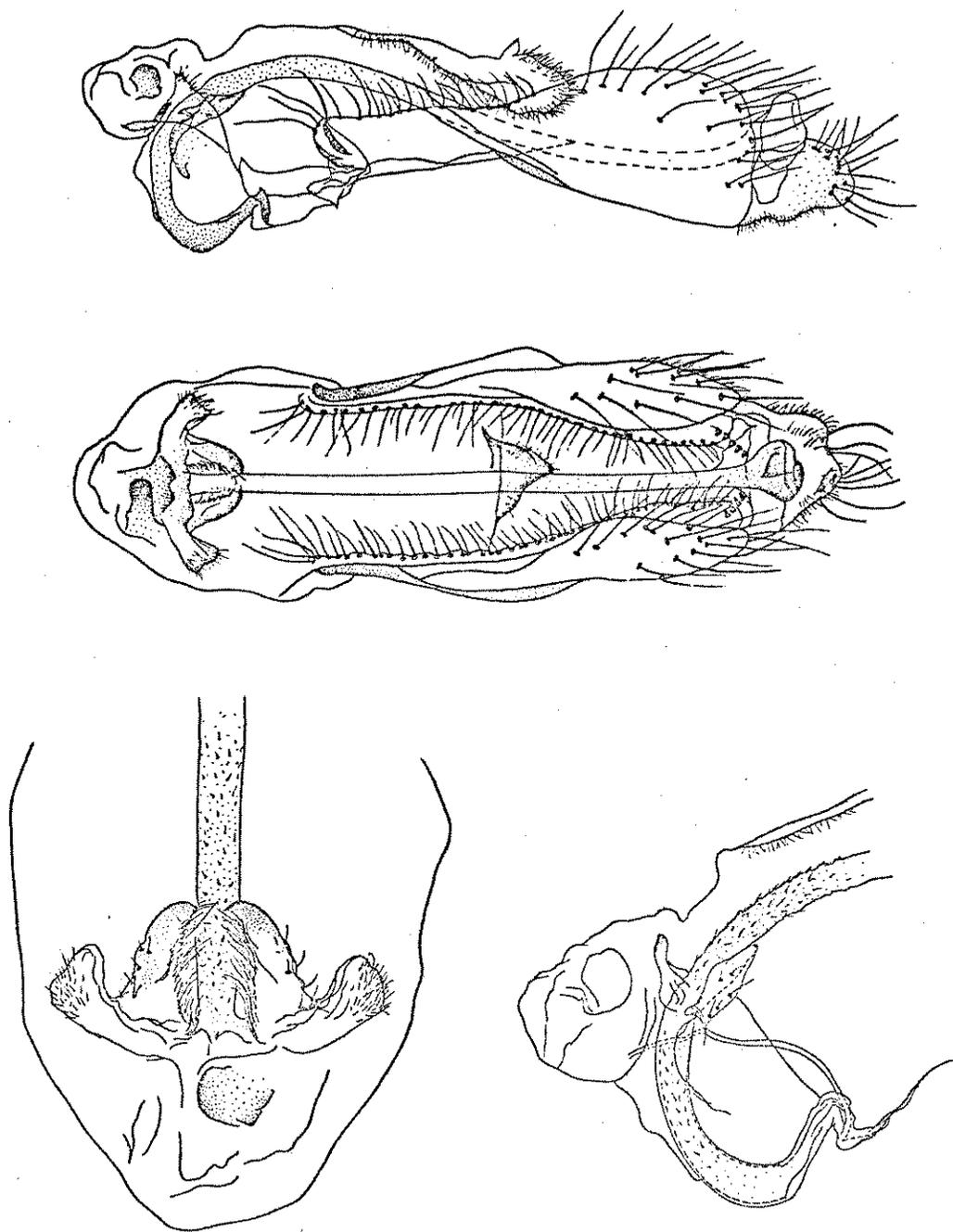
- ROGERS, J.S. Measures of genetic similarity and genetic distance  
Univ. Texas Publ., 7213:145-153, 1972.
- SANTOS, E. As moscas das frutas. Bol. Campo, 10(76):10-13 ,  
1954.
- SELANDER, R.K.; JOHNSON, W.E. Genetic variation among vertebra  
tes species. Ann. Rev. Ecol. Syst., 4:75-91, 1973.
- SHAW, C.R. Electrophoretic Variation in Enzymes. Science, 149  
:936-943, 1965.
- SHAW, C.R.; KOEN, L.A. Starch gel electroporesis of enzymes.  
IN: SMITH, I., ed. Chromatographic and Electrophoretic  
Techniques. New York, Interscience Publ., 1968, p.325-364.
- SHAW, C.R.; PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes-  
A compilation of recipes. Biochem. Gen., 4:297-320, 1970.
- SILVA, J.R. Moscas também são inimigas da mandioca. Suplemen-  
to Agrícola de O Estado de São Paulo, p.6, 512, 1965.
- SMITH, R.F.; VAN DEN BOSCH, R. Integrated Control. IN: KILGO-  
PE, W.W.; DOUTT, R.L., ed., Pest Control Biological Physical,  
and Selected Chemical Methods, New York, Academic Press, 1967  
p.259-340.
- SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variaa  
tion in the serum proteins of normal human adults. Biochem.  
J., 61:629-641, 1955.

- SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. Numerical Taxonomy. S. Francisco, Freeman Co., 1973.
- SOKAL, R.R.; SNEATH, P.H.A. Principles of numerical taxonomy. S. Francisco, Freeman, 1963.
- STERN, V.M.; SMITH, R.F.; VAN DEN BOSCH, R.; HAGEN, K.S. The integration of chemical and biological control of the spotted alfalfa aphid: integrated control concept. Hilgardia, 29:81—101, 1959.
- STONE, W.S.; WHEELER, M.R.; JOHNSON, F.M.; KOJIMA, K. Genetics variations in natural island populations of member of D.nasuta and D. ananassae subgroups. Proc. Nat. Sci. USA, 59:102-109, 1968.
- TOLEDO Fº, S.A. Differentiation of sibling species of "Rhyncosciara" by hemolymph electrophoresis (Diptera, Sciaridae). Rev. Bras. Biol, 29:3:289-293, 1969.
- TOLEDO Fº, S.A.; YANG, S.V. e PAVAN, C. Isozyme analysis in two sibling species of Rhyncosciara (Diptera, Sciaridae). Ciência e Cultura, 28(1):67-71, 1976.
- WAGNER, R.P.; SELANDER, R.K. Isozymes in insects and their significance. Ann. Rev. Entomol., 19:117-138, 1974.

9. APÉNDICE

FENOGRAMA DAS SETE ESPÉCIES DE SILBA ANALISADAS





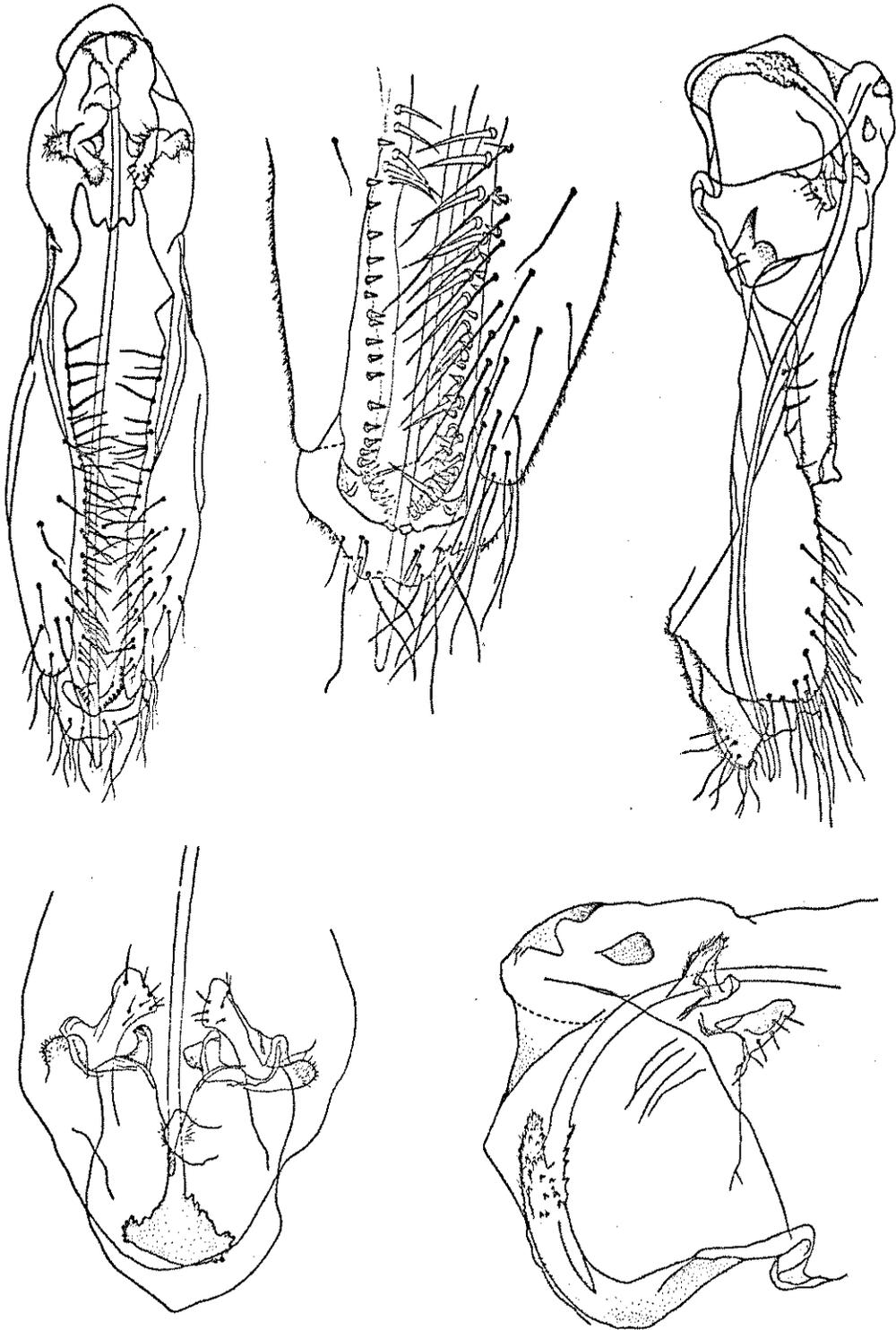
Prancha I - *Silba pseudopendula* (Korytkowski), espécie 1, macho.

Figura 1 - Pós-abdomem, vista lateral

Figura 2 - Ibidem, vista ventral

Figura 3 - Hypandrium com os pós-gonitos

Figura 4 - Base de aedeagus, vista ventro-lateral



Prancha II - *Silba*, espécie 2, macho

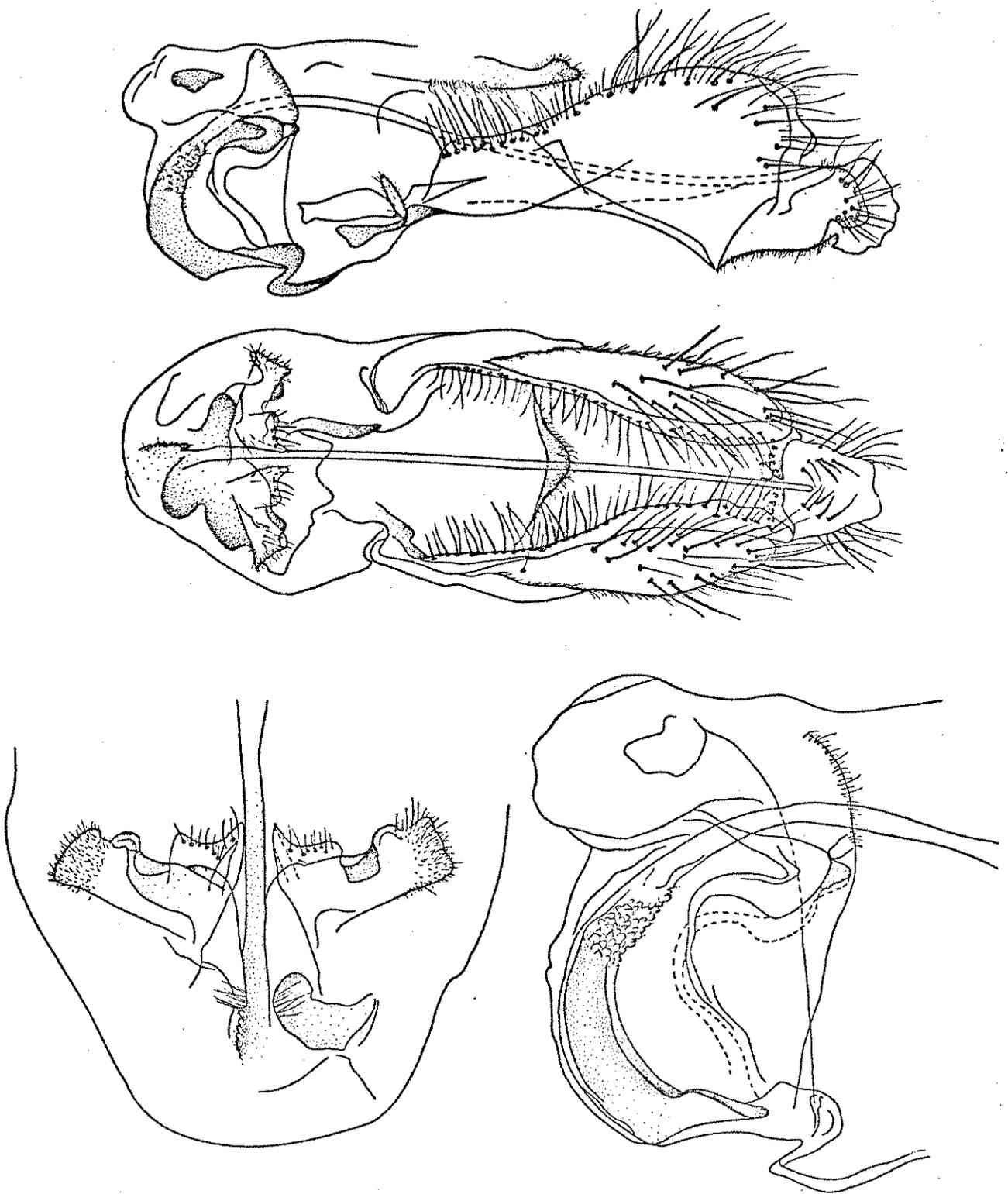
Figura 1 - Pôs-abdomem, vista lateral

Figura 2 - Ibidem, vista ventral

Figura 3 - Extremo apical do pôs-abdomem, vista ampliada

Figura 4 - Hypandrium com os pôs-gonitos

Figura 5 - Base de aedeagus, vista ventro-lateral



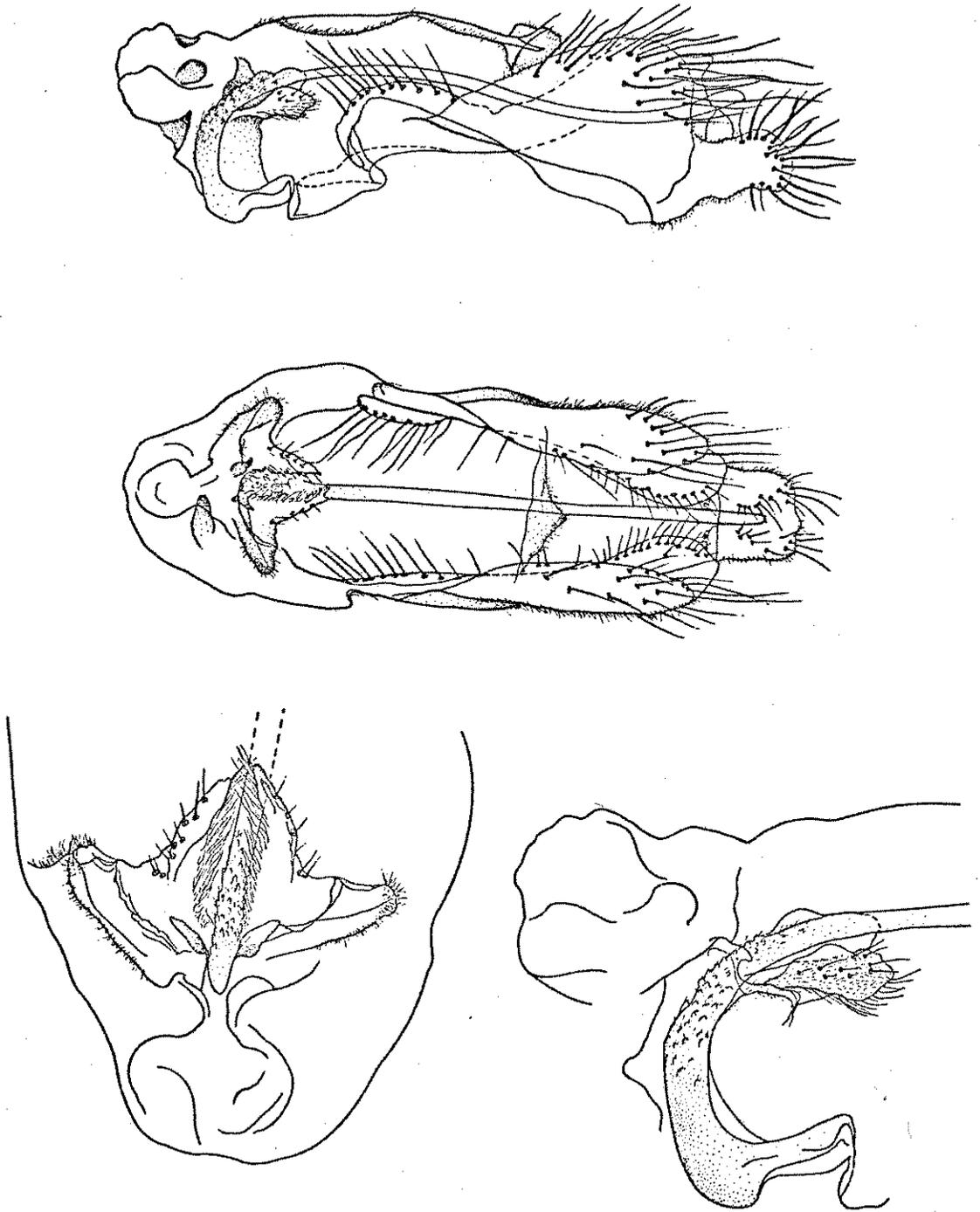
Prancha III - *Silba*, espécie 3, macho.

Figura 1 - Pós-abdomem, vista lateral

Figura 2 - Ibidem, vista ventral

Figura 3 - Hypandrium com os pós-gonitos

Figura 4 - Base do aedeagus, vista ventro-lateral



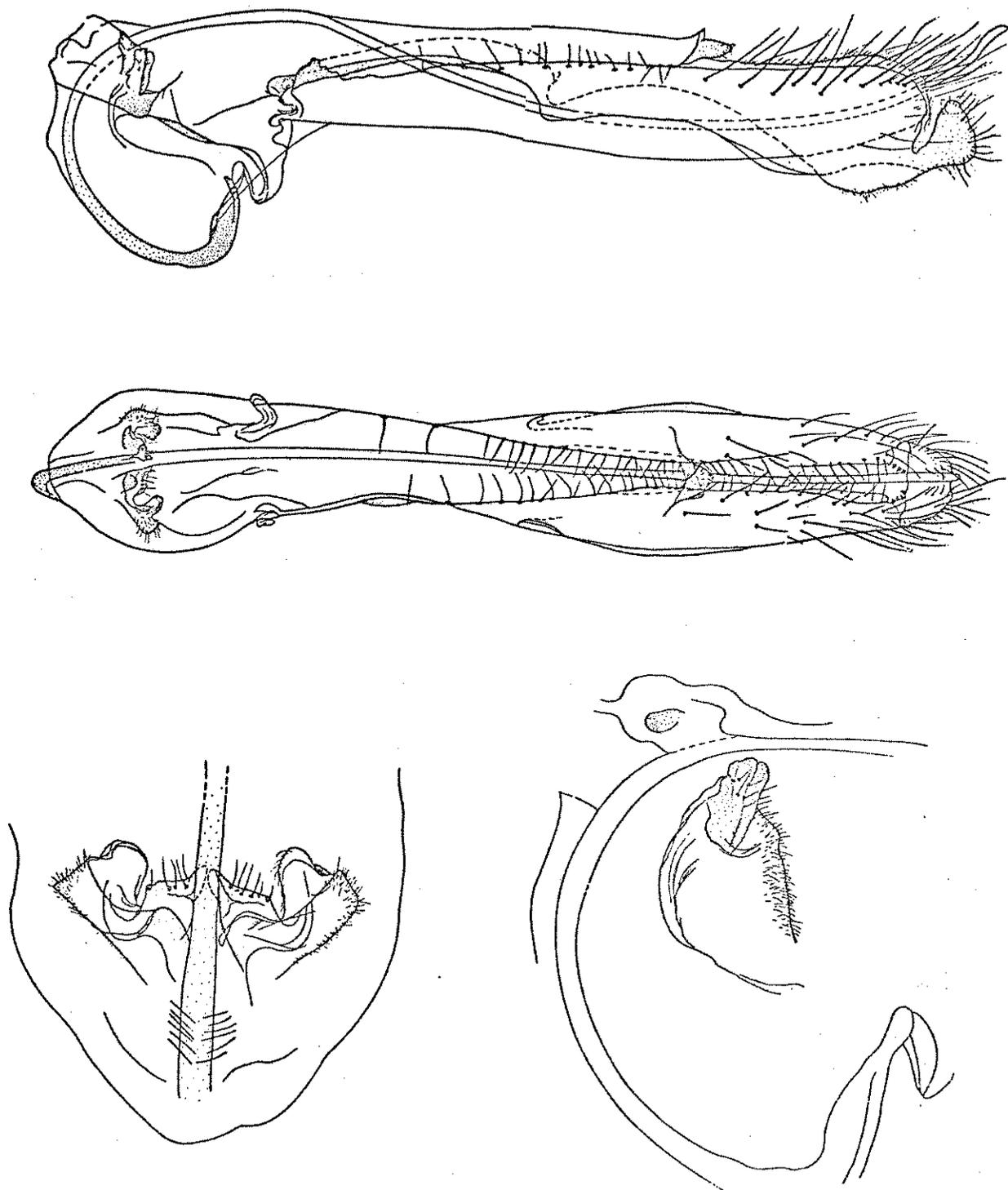
Prancha IV - *Silba*, espécie 4, macho.

Figura 1 - Pós-abdomem, vista lateral

Figura 2 - Ibidem, vista ventral

Figura 3 - Hypandrium com os pós-gonitos

Figura 4 - Base do aedeagus, vista ventro-lateral



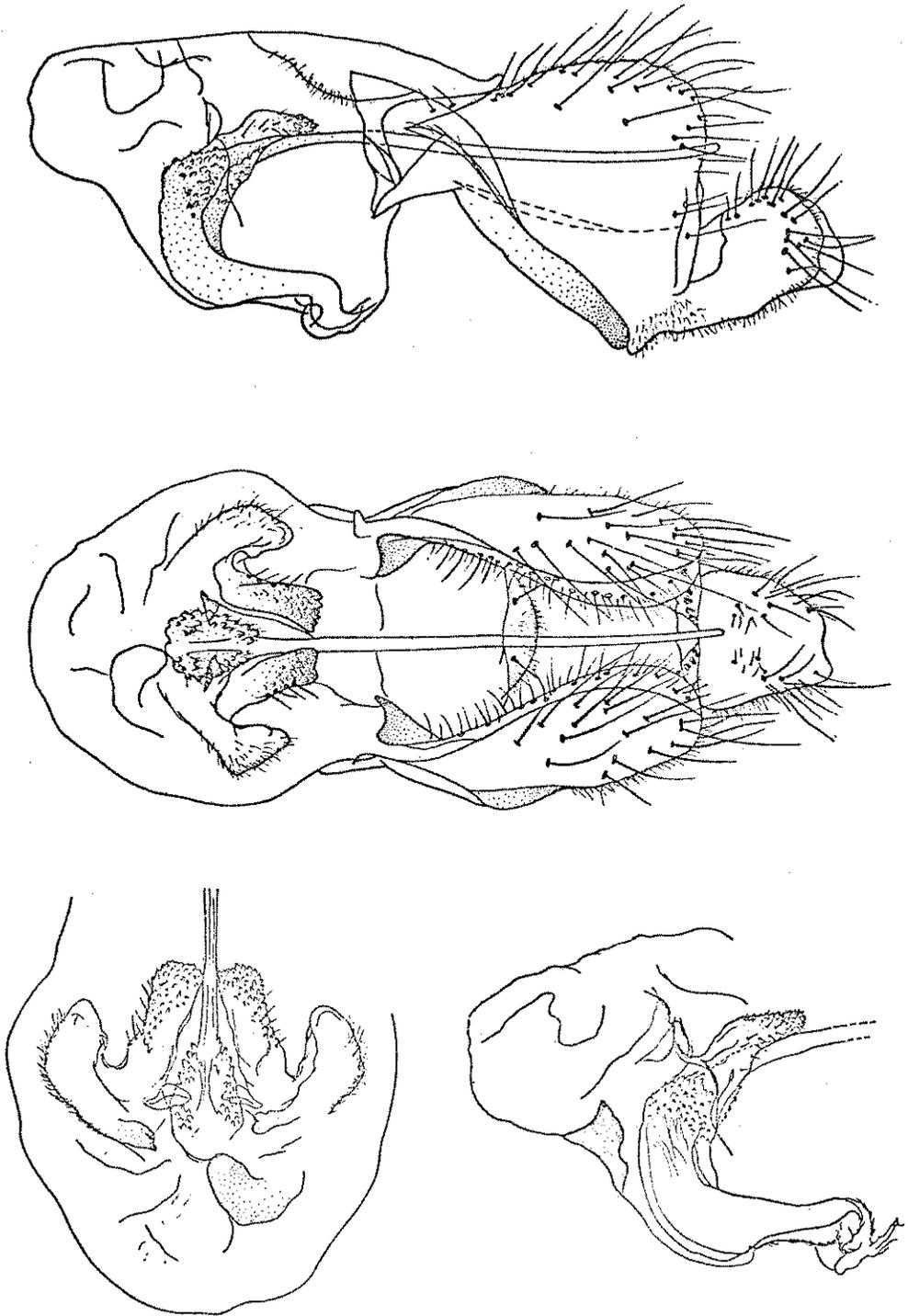
Prancha V - *Silba*, espécie 5, macho.

Figura 1 - Pós-abdomem, vista lateral

Figura 2 - Ibidem, vista ventral

Figura 3 - Hypandrium com os pós-gonitos

Figura 4 - Base do aedeagus, vista ventro-lateral



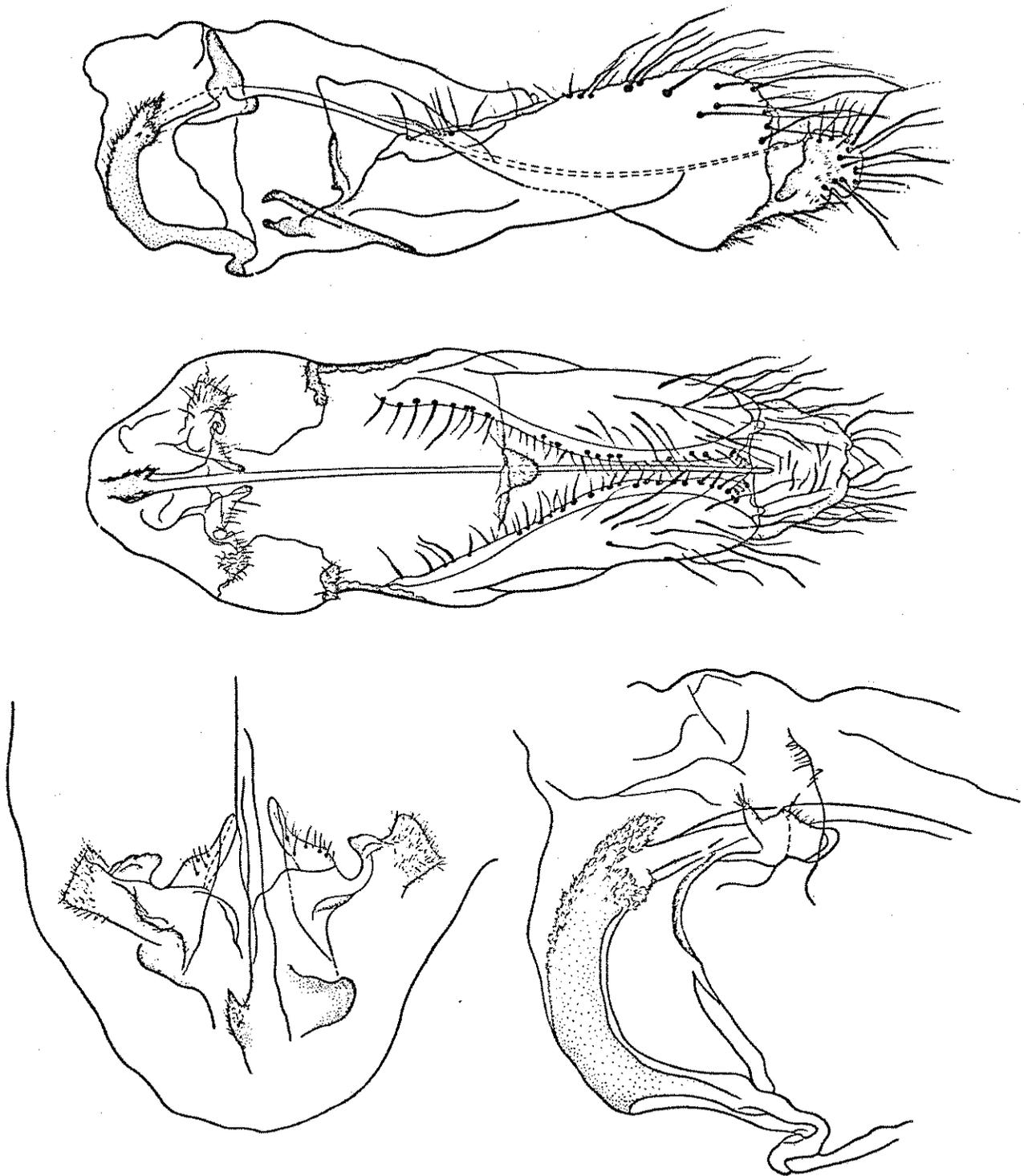
Prancha VI - *Silba*, espécie 6, macho.

Figura 1 - Pós-abdomem, vista lateral

Figura 2 - Ibidem, vista ventral

Figura 3 - Hypandrium com os pós-gonitos

Figura 4 - Base do aedeagus, vista ventro-lateral



Prancha VII - *Silba pendula* (Bezzi), espécie 7, macho.

Figura 1 - Pôs-abdomem, vista lateral

Figura 2 - Ibidem, vista ventral

Figura 3 - Hypandrium com os pôs-gonitos

Figura 4 - Base do aedeagus, vista ventro-lateral