

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Aluana Gonçalves de Abreu

ESTUDO EM UM FITÓFAGO ESPECIALISTA, *Tomoplagia reticulata*
(Diptera: Tephritidae), E SUA PLANTA HOSPEDEIRA,
Eremanthus glomerulatus (Asteraceae)

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

Aluana Gonçalves de Abreu

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título
de Doutor em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética
Animal e Evolução.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini

Campinas, fevereiro de 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Ab85e	Abreu, Aluana Gonçalves de Estudo em um fitófago especialista, <i>Tomoplagia reticulata</i> (Diptera: Tephritidae), e sua planta hospedeira, <i>Eremanthus glomerulatus</i> (Asteraceae) / Aluana Gonçalves de Abreu. – Campinas, SP: [s.n.], 2009. Orientadora: Vera Nisaka Solferini. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Interação inseto-planta. 2. Genética de populações. 3. Hibridação. 4. Genética animal. 5. Genética vegetal. I. Solferini, Vera Nisaka. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.
--------------	--

Título em inglês: A study in an specialist phytophagous, *Tomoplagia reticulata* (Diptera: Tephritidae), and its host plant, *Eremanthus glomerulatus* (Asteraceae).

Palavras-chave em inglês: Insect-plant interaction; Population genetics; Hybridization; Animal genetics; Plant genetics.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Vera Nisaka Solferini, Maria Imaculada Zucchi, Sérgio Russo Matioli, Galina Ananina, Ana Cláudia Lessinger.

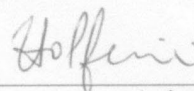
Data da defesa: 09/02/2009.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 9 de fevereiro de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini (Orientadora)

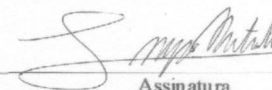


Assinatura

Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko

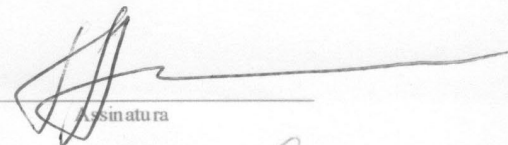
Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Russo Matioli



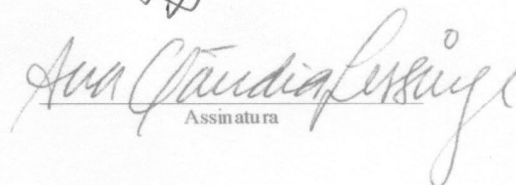
Assinatura

Profa. Dra. Galina Ananina



Assinatura

Profa. Dra. Ana Cláudia Lessinger



Assinatura

Profa. Dra. Maria Imaculada Zucchi



Assinatura

Prof. Dr. Paulo Inácio de Knecht López de Prado

Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo Espin

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos de doutorado e pelo doutorado sanduíche.

À FAPESP, pelo apoio financeiro ao projeto.

Aos membros da minha pré-banca.

Aos membros da minha banca.

À Profa. Vera Nisaka Solferini, pela orientação, pelas conversas e pelo apoio nestes 10 anos.

À Profa. Isabelle Olivieri, pela curta mas valiosa orientação das análises da minha tese e por me mostrar uma nova visão sobre genética.

Ao Prof. José Roberto Trigo por ceder seu laboratório e ajudar nas análises químicas.

Às pessoas que me ajudaram nas coletas.

Ao pessoal do laboratório de diversidade genética (IB-Unicamp), pelo convívio diário.

Às pessoas do Institut des Sciences de l'Evolution Montpellier e da Université Montpellier 2 pelo convívio curto mas enriquecedor.

Aos meus amigos.

À minha família.

ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO GERAL.....	3
INTERAÇÃO ENTRE <i>TOMOPLAGIA RETICULATA</i> E <i>EREMANTHUS GLOMERULATUS</i>	3
USO DE MARCADORES PARA A ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA E QUÍMICA.....	8
ISOZIMAS.....	8
RFLP DO DNA MITOCONDRIAL.....	9
SESQUITERPENOS.....	11
ÁREA DE ESTUDO.....	13
CAPÍTULO 1 – INFLUÊNCIA DA VARIABILIDADE GENÉTICA E QUÍMICA DE <i>EREMANTHUS GLOMERULATUS</i> NA DISTRIBUIÇÃO DE <i>TOMOPLAGIA RETICULATA</i>	
INTRODUÇÃO.....	16
MATERIAL E MÉTODOS	
<i>EREMANTHUS GLOMERULATUS</i>	17
COLETA DOS INDIVÍDUOS.....	18
ISOZIMAS.....	20
QUÍMICA.....	21
ANÁLISES UTILIZADAS	
ISOZIMAS.....	23
QUÍMICA.....	23
RELAÇÃO PLANTA-PARASITA.....	24
RESULTADOS	
ISOZIMAS.....	24
QUÍMICA.....	26
RELAÇÃO PLANTA-PARASITA.....	27
DISCUSSÃO	
VARIABILIDADE GENÉTICA EM <i>E. GLOMERULATUS</i>	30

VARIABILIDADE QUÍMICA EM <i>E. GLOMERULATUS</i>	32
RELAÇÃO PLANTA-PARASITA.....	33
CAPÍTULO 2 – PADRÕES DE DIFERENCIAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA EM UM FITÓFAGO ESPECIALISTA, <i>TOMOPLAGIA RETICULATA</i> .	
INTRODUÇÃO.....	36
MATERIAL E MÉTODOS	
COLETA DOS INDIVÍDUOS.....	38
PROCEDIMENTOS DE ELETROFORESE.....	39
ANÁLISE UTILIZADAS.....	40
RESULTADOS.....	41
DISCUSSÃO	
DIVERSIDADE GENÉTICA.....	47
ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA.....	48
CAPÍTULO 3 – EVIDÊNCIAS GENÉTICAS DE UMA ZONA DE CONTATO ENTRE DUAS ESPÉCIES CRÍPTICAS DE <i>TOMOPLAGIA</i> .	
INTRODUÇÃO.....	51
MATERIAL E MÉTODOS	
COLETA DOS INDIVÍDUOS.....	53
ISOZIMAS.....	55
PCR-RFLP DO mTDNA.....	57
ANÁLISE UTILIZADAS	
ISOZIMAS.....	57
PCR-RFLP DO mTDNA.....	58
RESULTADOS	
ISOZIMAS.....	59
PCR-RFLP DO mTDNA.....	64
DISCUSSÃO.....	70
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

Resumo

Tomoplagia reticulata (Diptera: Tephritidae) é um fitófago especialista em *Eremanthus glomerulatus* (Asteraceae). Os adultos ovipõem nas inflorescências da planta hospedeira, onde as larvas se desenvolvem. O histórico de coletas de *T. reticulata* mostra uma grande variação na quantidade de insetos infestando cada indivíduo de *E. glomerulatus*. A fim de verificar se a variação no número de herbívoros nas populações do hospedeiro é associada a alguma característica química e/ou genética deste, comparamos as variabilidades genética e química entre indivíduos de *E. glomerulatus* com diferentes níveis de infestação por *T. reticulata* (cap. 1). *Eremanthus glomerulatus* tem baixa variabilidade genética, provavelmente associada à distribuição restrita desta espécie. Apesar da distribuição fragmentada, há pouca estruturação entre as populações desta planta, explicada pelo maior fluxo gênico entre ambientes fragmentados em espécies anemocóricas. As características genéticas e químicas de *E. glomerulatus* não explicam a variação no nível de herbivoria das populações do hospedeiro. No capítulo 2, testamos a hipótese de que fitófagos especialistas apresentam maior diferenciação genética e menor diversidade do que generalistas, comparando o nível de variabilidade e estrutura genética de *T. reticulata* com o de outros fitófagos com diferentes amplitudes de hospedeiro. As populações de *T. reticulata* apresentaram baixa variabilidade e grande estruturação genética, o que é associado à distribuição fragmentada da planta hospedeira, que restringe a distribuição das pequenas populações do inseto. No capítulo 3, caracterizamos a composição genética das populações de *Tomoplagia reticulata* e de *T. pallens*, uma espécie irmã. Ambas as espécies parasitam *E. glomerulatus*; *T. reticulata* ocorre em MG e *T. pallens* em GO. Há uma zona de contato entre as espécies no Sul de MG, onde elas hibridizam. Ocasionalmente *T. pallens* chega ao centro de MG (Santana do Riacho), região mais fria. Esta migração provavelmente está associada a anos excepcionalmente quentes.

Abstract

Tomoplagia reticulata (Diptera: Tephritidae) is a phytophagous insect which is specialist on *Eremanthus glomerulatus* (Asteraceae). Adults oviposit in flower heads, where larvae develop. Sampling records for *T. reticulata* show that there is great variation in the number of insects parasitizing each plant. To verify if this variation is associated with chemical or genetic characteristics of the host plant, we assayed *E. glomerulatus*' genetic and chemical variability and compared between individuals with different levels of infestation by *T. reticulata* (chapter 1). *Eremanthus glomerulatus* has low genetic variability, probably related to its narrow geographic distribution. There is low genetic structure among populations despite its fragmented distribution, due to enhance gene flow in fragmented habitats in anemocoric species. *E. glomerulatus*' chemical and genetic characteristics don't explain variation in herbivory. In chapter 2, we tested the hypothesis that herbivorous insect species with narrow diet breadth are expected to be more prone to genetic differentiation and lower genetic diversity than insect species with a wider diet breadth, comparing *T. reticulata*'s genetic variability and structure with other phytophagous with different host ranges. *Tomoplagia reticulata* has low genetic variability and great genetic structure, which is associated with its host fragmented distribution that restricts the distribution of insect populations. In chapter 3, we described genetic composition of *Tomoplagia reticulata* and *T. pallens*, a sister species. Both of them parasitize *E. glomerulatus*; *T. reticulata* occurs in MG and *T. pallens* in GO. There is a contact zone between them in southern MG, where they hybridize. Occasionally, *T. pallens* arrives in the center of MG (Santana do Riacho), a colder region. This migration is probably associated with extremely hot years.

INTRODUÇÃO GERAL

Interação entre *Tomoplagia reticulata* e *Eremanthus glomerulatus*

Um inseto é considerado fitófago se em qualquer estágio de desenvolvimento se alimenta de tecidos vegetais vivos ou seiva, excluindo pólen ou néctar. Eles podem ser polípagos, oligófagos ou monófagos, segundo sua amplitude de dieta. No conceito mais restrito, monófago é o fitófago que se alimenta em apenas uma espécie de planta hospedeira mas o termo também é empregado para especialistas em um único gênero de planta. Oligófagos se alimentam em algumas espécies, de hospedeiro geralmente dentro de uma única família. Já polípagos se alimentam em uma grande variedade de plantas, de diferentes famílias.

O número de espécies parasitadas por um fitófago é limitado principalmente por dois fatores: os compostos secundários das plantas e as pressões seletivas de inimigos naturais (Jaenike 1990, Bernay & Graham 1988, Becerra 1997). Os metabólitos secundários geralmente restringem a variedade de hospedeiros que um inseto pode utilizar. Segundo Jermy (1966), as características químicas são a principal informação usada pelos insetos no reconhecimento de uma planta e a presença ou ausência de substâncias secundárias desempenha um papel decisivo na seleção ou na rejeição de uma espécie de hospedeiro. Além de ajudar na identificação das plantas, substâncias químicas podem fornecer informações sobre condições ambientais bióticas através de uma mistura de até centenas de compostos diferentes (Dicke 2000). Visto que os compostos das plantas desempenham um papel tão importante na escolha dos insetos, a habilidade dos fitófagos de perceber e discriminar entre eles deve ser grande (Simmonds 2001).

A principal pressão seletiva exercida por outros organismos é a competição. As fêmeas normalmente evitam depositar ovos em recursos já explorados, um comportamento

que presumidamente reduz a competição sofrida pela sua prole (Prokopy 1981). A presença de ninhadas é indicada pela liberação de compostos pela planta em resposta aos danos causados pela oviposição (Cirio 1971) ou pela destruição de tecidos pelas larvas (Renwick & Radke 1981, Fitt 1984, Landolt 1993) e/ou pelos adultos (Heard 1995). Além disso, pode ocorrer também a liberação de feromônios para diminuir a competição intraespecífica. *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae), por exemplo, arrasta o ovipositor na superfície do fruto, após colocar os ovos, liberando um feromônio que evita oviposições subseqüentes (ODP) (Prokopy *et al.* 1982). Até o momento já foi observada a presença de feromônios marcadores em 20 famílias de insetos fitófagos (Nufio & Papaj 2001), incluindo Tephritidae.

Três subfamílias de Tephritidae são reconhecidas, Dacinae, Trypetinae e Tephritinae, distribuídas nas regiões temperada, subtropical e tropical, com a maior diversidade ocorrendo nos trópicos (Foote *et al.* 1993, Headrick & Goeden 1998). Dacinae e Trypetinae usam os frutos carnosos de seus hospedeiros como fonte de alimento larval. Por apresentarem grande importância econômica, essas subfamílias têm sido bastante estudadas. Já a subfamília Tephritinae, que usa a parte vegetativa e as inflorescências dos hospedeiros como alimento para as larvas (Foote *et al.* 1993, Headrick & Goeden 1998), é bem menos conhecida.

Segundo Zwölfer (1982), as espécies de Tephritinae são geralmente uni- ou bivoltinas, razoavelmente sedentárias e têm um baixo potencial reprodutivo. Com poucas exceções, os adultos deste grupo vivem pouco e quase toda a vida do inseto é sobre, dentro ou em partes do hospedeiro. Eles ovipõem entre 50 e 150 ovos durante a vida; as larvas se desenvolvem em 20-40 dias e geralmente empupam dentro do hospedeiro. Apresentam uma estreita relação com seu hospedeiro e exploram principalmente as inflorescências, que são

estruturas relativamente estáveis da planta e uma fonte de alimento altamente previsível. Não existem estudos sobre o comportamento reprodutivo de espécies da subfamília Tephritinae.

Os hospedeiros da subfamília Tephritinae são principalmente plantas da família Asteraceae, com algumas espécies de inseto infestando um grande número de espécies, gêneros e tribos desta que é a maior das famílias de fanerógamas. Os capítulos das mesmas oferecem alimento concentrado em um sítio protegido e, por isso, abrigam uma fauna rica e diversificada de insetos endófagos (Lewinsohn 1988). Como os representantes desta subfamília são capazes de causar danos substanciais a seus hospedeiros, destruindo suas sementes e reduzindo sua capacidade competitiva, algumas espécies têm sido usadas no controle biológico de plantas daninhas introduzidas (White 1988).

Tomoplagia (Coquillett) é o gênero de Tephritinae mais abundante no Brasil (Prado *et al.* 2002). As fêmeas ovipõem nas inflorescências das compostas, onde as larvas endófagas se desenvolvem. Segundo Prado & Lewinsohn (1994), *Tomoplagia* está primariamente associado à subtribo Vernoniinae, mas algumas espécies são encontradas em plantas da subtribo Lychnophorinae (Prado *et al.* 2002), como *Tomoplagia reticulata* (figura 1).

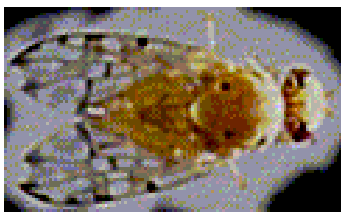


Figura 1: Foto de um indivíduo adulto de *Tomoplagia reticulata*.

Tomoplagia reticulata parasita exclusivamente *Eremanthus glomerulatus* (figuras 2 e 3). A distribuição deste fitófago é restrita ao estado de Minas Gerais, em áreas de ocorrência da planta hospedeira. O gênero *Eremanthus* Less. (Asteraceae) compreende 27

espécies (Robinson 1999) de árvores e arbustos de inflorescências sincéfalas que estão em sua maioria restritas ao cerrado do platô central do Brasil (MacLeish 1987). *E. glomerulatus* são arvoretas de 2-10m de altura com até 20 cm de diâmetro. É uma espécie alógama e anemocórica. A floração e a frutificação ocorrem de março a outubro. Está distribuída nos estados de Minas Gerais, Goiás e áreas adjacentes na Bahia e em São Paulo, em altitudes de 700 a 1500 m. É encontrada em grandes colônias, principalmente nas áreas de transição de vegetação campo rupestre-cerrado (MacLeish 1987).



Figura 2: Hábito, morfologia e ambiente típicos de *Eremanthus glomerulatus*.



Figura 3: Detalhe das inflorescências de *Eremanthus glomerulatus*.

As coletas já realizadas de *T. reticulata* (Abreu 2003) mostraram uma variação na quantidade de insetos infestando cada indivíduo de *E. glomerulatus*, mesmo entre plantas de uma mesma moita. Esta variação pode indicar a preferência dos insetos por determinadas plantas, que apresentam condições mais adequadas para o desenvolvimento da prole, ou apenas um acontecimento incidental. A escolha de uma planta com condições adequadas é essencial em *T. reticulata* já que as larvas não têm mobilidade para trocar de ambiente. Em vários sistemas envolvendo herbívoros, já foi observada uma variação no nível de herbivoria dentro de uma única espécie hospedeira (e.g. Whitham & Mopper 1985, Stiling & Simberloff 1989). Há casos em que os insetos fitófagos formam demes adaptados a traços de um único indivíduo (Edmunds & Alstad 1978, Boecklen & Mopper 1998).

Muitos estudos já exploraram os fatores relacionados à escolha da espécie hospedeira, considerando uma espécie ou gênero de fitófago (e.g. Becerra 1997, Becerra & Venable 1999). Entretanto, há poucos que exploraram a escolha individual, ou seja, que fatores levam à escolha de determinada planta dentre vários indivíduos da mesma espécie (Mopper 1996). Este conhecimento pode contribuir para o entendimento do potencial de

adaptação local dos parasitas e para a compreensão de fenômenos históricos relacionados à colonização de novos locais.

OBJETIVOS GERAIS

- a) quantificar o grau de infestação de *E. glomerulatus* por adultos de *T. reticulata*.
- b) avaliar a estruturação genética das populações de *T. reticulata*.
- c) avaliar a estruturação genética de *E. glomerulatus* e suas características químicas.
- d) investigar se a quantidade de parasitas em uma planta é correlacionada com suas características químicas ou genéticas

Uso de marcadores para a análise da variabilidade genética e química

1) Isozimas

Técnicas de eletroforese de proteínas foram introduzidas nos anos 60 e ainda permanecem uma opção simples e popular de marcadores nucleares com várias aplicações ecológicas e evolutivas (Avisé 2004). A influência da eletroforese de enzimas no nosso entendimento da estrutura genética de populações naturais é inestimável. Desde que foi aplicada pela primeira vez em genética de populações, ela tem sido amplamente usada em sistemática, evolução, ecologia e biologia da conservação (Leberg 1996).

As vantagens dos dados obtidos da eletroforese são objetividade, codominância, maior conjunto de dados existentes para muitos organismos, baixo custo se comparado com outros métodos moleculares e curto tempo de processamento dos dados (van der Bank *et al.* 2001). As limitações, por outro lado, são a presença de alelos nulos, a incapacidade de detectar uma parte da variação que ocorre na sequência de DNA, a modificação pós-traducional das isozimas (Leberg 1996) e a possibilidade de ocorrência de genótipos com diferentes valores adaptativos, geralmente relacionados a fatores ambientais (Nevo 1990, Powers *et al.* 1991).

Várias pesquisas têm enfatizado a eficiência de enzimas para a estimativa e entendimento da variabilidade genética em populações naturais (Vaupel *et al.* 2007), fluxo gênico, hibridação (Alexandrino *et al.* 2006), reconhecimento de limites de espécies (Rowe *et al.* 2007,) e relações filogenéticas (Tiley *et al.* 2008), entre outros problemas (Murphy *et al.* 1996). Apesar de atualmente serem menos usadas para a reconstrução de filogenias interespecíficas (Sperling *et al.* 1997, Mardulyn *et al.* 1997), isozimas têm se mantido uma referência em estudos de estrutura populacional (Zitari-Chatti *et al.* 2008, Verspoor *et al.* 2005), principalmente em envolvendo marcadores com diferentes tipos de herança (Grundmann *et al.* 2008).

2) RFLP do DNA mitocondrial animal

O DNA mitocondrial (mtDNA) animal apresenta atributos de um marcador molecular ideal para análise filogenética: apresenta conteúdo e arranjo em genes conservados; é fácil de isolar e manipular; tem uma estrutura genética simples pois regiões espaçadoras são raramente descritas e íntros, pseudogenes e seqüências repetitivas são raras ou ausentes; exibe um modo de transmissão direto, geralmente sem recombinação ou outro rearranjo genético; evolui a uma taxa rápida, de forma que novos estados de caráter surgem no período de vida de uma espécie. Por outro lado, nenhum sistema molecular é perfeito para análise, e o mtDNA animal apresenta algumas limitações que devem ser consideradas como: heteroplasmia, homoplasia, desvio de amostragem devido a herança materna (Avice *et al.* 1987), contribuição paterna na herança (Zouros *et al.* 1992, Schwartz & Vissing 2002, Zhao *et al.* 2004) e recombinação entre moléculas (Ashkenas 1997, Howell 1997, Saville *et al.* 1998, Rokas *et al.* 2003, Tsaousis *et al.* 2005)

O mtDNA tem sido usado extensivamente em estudos populacionais de muitas espécies de insetos devido às características já citadas e porque possui um menor tempo de

coalescência. Muitas regiões são bastante conservadas de forma que os *primers* podem ser usados em diferentes *taxa* de insetos (Roderick 1996). A variação no mtDNA pode ser examinada através de seqüenciamento ou análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP).

Enquanto o seqüenciamento de DNA é o método escolhido pela maioria dos estudos moleculares sistemáticos, não se deve esquecer que muitas alternativas podem ser mais apropriadas ou mais práticas para certas aplicações. O seqüenciamento é geralmente o mais apropriado para estudos interespecíficos ou acima disso. Entretanto, questões de estrutura populacional intraespecífica, limites de espécie e diagnose de espécies geralmente pode ser efetivamente respondidas usando outras técnicas como RFLP (Caterino *et al.* 2000).

Além disso, apesar do seqüenciamento fornecer informações mais detalhadas do mtDNA, deve-se considerar a velocidade e custo de uma técnica quando o poder da análise estatística depende de amostras de tamanho moderado a grande, e o RFLP pode ser consideravelmente mais rápido e barato que o seqüenciamento. Um melhor entendimento da arquitetura genética de populações e espécies próximas sempre requererá uma amostragem de larga escala geográfica e numérica. Amostras moderadas a grandes podem também permitir resolver a história demográfica de uma espécie além de sua história filogenética (Bermingham *et al.* 1996).

Os marcadores do tipo RFLP apresentam uma série de vantagens em relação aos marcadores morfológicos, citológicos ou de isozimas, tais como: são herdados como marcadores mendelianos livres de pleiotropia, não são afetados pelo ambiente, podem ser obtidos em número elevado e têm distribuição aleatória no genoma (Arias & Infante-Malachias 2001). Numa variação da técnica de RFLP, há a possibilidade de amplificar determinada seqüência gênica ao invés de lidar com todos os genes mitocondriais. PCR-

RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*) é uma abordagem simples que permite uma rápida análise de um grande número de indivíduos (Bermingham *et al.* 1996).

3) Sesquiterpenos

O metabolismo de uma planta pode ser dividido em básico ou primário e secundário. O metabolismo básico refere-se aos processos anabólicos e catabólicos necessários para a respiração, assimilação de nutrientes e crescimento/desenvolvimento. Já o metabolismo secundário refere-se aos compostos presentes em células especializadas que não são necessários para a sobrevivência das células, mas sim para a sobrevivência da planta no ambiente. Acredita-se que estes compostos ajudem tanto na prevenção de herbivoria por insetos e patógenos quanto na reprodução, através da atração de polinizadores via essências florais ou coloração (Wink 1988).

Por terem atividades biológicas extremamente diversas, os metabólitos secundários estão presentes aos milhares nas plantas e são úteis como marcadores taxonômicos nos diferentes níveis da hierarquia, inclusive, na investigação de problemas taxonômicos e evolutivos infraespecíficos (Mabry 1970, Crawford 1978, Gottlieb & Kubitzki 1984, Rudloff & Lapp 1992, Adams *et al.* 1993, Grayer *et al.* 1999, Harborne 2000, Trigo *et al.* 2003). Dentre os metabólitos secundários, os terpenóides são considerados o grupo mais diverso, sendo encontrados em todas as famílias de plantas (Buckingham 1998, Theis & Lerdau 2003). Eles são normalmente produzidos em tecidos vegetativos, flores e, ocasionalmente, em raízes (Dudareva *et al.* 2004). Essa classe de compostos tem sido utilizada com sucesso em estudos que investigam as relações taxonômicas e evolutivas nos mais diversos níveis hierárquicos (Harbone & Turner 1984, Skoula *et al.* 1999) e são altamente defensivos contra herbívoros, tanto individualmente quanto em conjunto

(Harbone 2001). Terpenos funcionam como atrativos de polinizadores, fungicidas, pesticidas, fitotoxinas, agentes anti-herbívoros e abortivos de larvas de insetos (Croteau 1987, Duke *et al.* 1988, Kelsey *et al.* 1982, Kelsey 1986, Weins *et al.* 1991). A menor unidade que compõe um terpenóide é o isopreno (figura 4) e eles são classificados segundo o número de isoprenos que possuem: monoterpenóides possuem 2 unidades, sesquiterpenóides possuem 3, diterpenóides possuem 4 e triterpenóides possuem 6.

Terpenóides são particularmente abundantes em algumas famílias de dicotiledôneas, sendo bem representados em Asteraceae (Charlwood & Banthorpe 1991), onde se destacam juntamente com poliacetilenos, flavonóides, cumarinas, benzofuranos e benzopiranos (Seaman *et al.* 1990; Hertz 1996; Emerenciano *et al.* 1998). Eles foram escolhidos para este estudo por serem relativamente estáveis e relacionados com vários compostos fisiologicamente potentes como reguladores de crescimentos e lactonas sesquiterpênicas (Bidwell 1974, Kelsey *et al.* 1982).

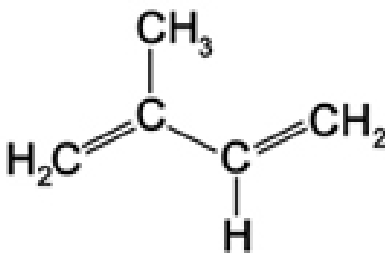


Figura 4: Estrutura química do isopreno, menor unidade de um terpenóide.

Em *Eremanthus*, muitas espécies já foram submetidas a estudos químicos, sendo identificados lactonas sesquiterpênicas (Vichnewski *et al.* 1976), flavonóides (Vichnewski & Gilbert 1972, Vichnewski *et al.* 1989, Raffauf *et al.* 1975, Bohlmann *et al.* 1980, Mauro *et al.* 1993, Lunardello *et al.* 1995) e óleos essenciais (Craveiro *et al.* 1989, Matos *et al.* 1988, Menezes *et al.* 1990). O maior interesse na caracterização química deste gênero deve-

se à atividade schistosomicida de algumas lactonas sesquiterpênicas (Vichnewski & Gilbert 1972, Vichnewski *et al.* 1976).

Áreas de estudo

O Cerrado é um dos biomas mais ricos e ameaçados do planeta, representando um dos *hotspots* mundiais da biodiversidade (Myers *et al.* 2000). Dentro do bioma do Cerrado as vegetações de canga e campo rupestre representam as áreas mais críticas e ameaçadas (Ministério do Meio Ambiente 1999). Os campos rupestres ocorrem em regiões com altitude superior a 1000m, onde predominam afloramentos rochosos de quartzito. Sua flora esclerófila é adaptada a condições extremas, tais como alta insolação, solos rasos com baixa umidade e nutricionalmente pobres, e apresenta alto grau de endemismo, com várias espécies ameaçadas de extinção (Mendonça & Lins 2000).

O cerrado apresenta uma fisionomia muito variável de acordo com a proporção entre elementos lenhosos (árvores e arbustos) e herbáceos. Quando os primeiros predominam, temos a fisionomia florestal conhecida como cerradão; quando predomina o componente herbáceo, temos o campo cerrado e o campo sujo; nas situações intermediárias, ocorre o cerrado *stricto sensu* (Veloso *et al.* 1991). O campo limpo (rupestre) corresponde à vegetação baixa, sem árvores ou com raras arvoretas, muito afastadas entre si (Rizzini 1997). É um tipo de vegetação altamente especializado que em áreas montanhosas das regiões nordeste, centro-oeste e sudeste do Brasil, principalmente na Bahia e em Minas Gerais. É caracterizada por uma vegetação aberta e herbácea, crescendo em solos arenosos e pedregosos, misturada com ervas e moitas crescendo em ilhas de afloramentos de quartzito, arenito, gnaiss ou canga (Giulietti & Pirani 1988, Borba & Semir 1998). Os campos rupestres são interrompidos por regiões de menores altitudes, ocupadas

originalmente por mata, cerrado e/ou caatinga, fazendo com que as espécies de plantas ocorram, na maioria das vezes, em populações fragmentadas (Semir 1991).

Plantas de *Eremanthus glomerulatus* são encontradas principalmente nos estados de Minas Gerais, Goiás e áreas adjacentes na Bahia e em São Paulo, em áreas de transição de vegetação campo rupestre-cerrado, em altitudes de 700 a 1500m (MacLeish 1987). Como o cerrado é amplamente distribuído nestes estados, a distribuição de *E. glomerulatus* é restringida pela ocorrência de campos rupestres. Há duas áreas principais de campo rupestre no Brasil: ao longo da Cadeia do Espinhaço e nas montanhas do sul de Minas Gerais. Estas duas áreas têm características geológicas e floras distintas.

A Cadeia do Espinhaço se estende por aproximadamente 1000 km em seu eixo N-S e varia de 50 a 100 km de largura. A Cadeia não é uma formação geológica contínua, sendo composta de várias cadeias de montanha e afloramentos rochosos distintos e, geralmente, isolados. A Serra do Cipó está localizada na região central de Minas Gerais, na porção sul da Cadeia do Espinhaço, no município de Santana do Riacho. O clima é tropical de montanha com temperatura média anual variando de 17 a 18,5 ° C e precipitação média anual entre 1450 e 1850 mm (Antunes 1986). A região é coberta por cerrado, cuja estrutura muda gradualmente com a altitude. O cerrado com estrutura arbórea ocorre em altitudes menores (800 e 900m). Entre 900 e 1000 m, o cerrado só é encontrado em fragmentos isolados em solos lateríticos mais profundos. Nas rochas quartzíticas, uma vegetação rupestre predomina. Ela ocorre de 900m até o cume (1500-1600 m) e contém várias espécies endêmicas (Giulietti 1996). De 1200 m até o cume, predominam gramíneas de alta altitude e solos quartzíticos, com pequenos fragmentos de campo rupestre.

Lavras, Carrancas, São Thomé das Letras e Luminárias localizam-se na região montanhosa do sul de Minas Gerais. A vegetação primitiva desta área compreende um

mosaico composto de manchas de floresta, cerrado, campo de altitude e campo rupestre (Eiten 1982). Esta notável variação fisionômica da vegetação deve-se a dois motivos principais. Em primeiro lugar, a região abriga uma das áreas de transição entre os cerrados do Brasil Central e as florestas semidecíduas do Sudeste e Sul do país. Em segundo lugar, esta transição se verifica em pleno domínio da serra da Mantiqueira, cujo relevo acidentado promove uma grande variação ambiental com fisionomias vegetais peculiares nas maiores altitudes. De uma maneira geral, as fisionomias de campo rupestre e campo de altitude estão associadas aos solos rasos e jovens do alto das montanhas, ao passo que em altitudes menores, nos solos mais antigos e profundos, ocorrem cerrados ou florestas (Oliveira-Filho *et al.* 1994).

O clima dominante no sul de Minas Gerais é tropical de altitude, com temperatura média anual variando de 19 a 21°C e de precipitação média anual entre 1200 e 1500mm (Queiroz *et al.* 1980). A vegetação é composta pelos cerrados, campos cerrados, matas de galeria, matas de encosta e campos rupestres (Queiroz *et al.* 1980). Os campos cerrados constituem a fisionomia vegetal predominante até 900 m de altitude, dando lugar aos campos rupestres, no intervalo de 900 e 1100m de altitude (Carvalho 1992).

Capítulo 1 – Influência da variabilidade genética e química de *Eremanthus glomerulatus* na distribuição de *Tomoplagia reticulata*

INTRODUÇÃO

A interação inseto-planta é uma das associações mais diversas entre táxons da comunidade terrestre. Sua especificidade provavelmente não tem uma causa principal sendo atribuída a fatores extrínsecos ou intrínsecos à relação. Fatores extrínsecos podem incluir pressões de comunidade como competição interespecífica ou predação (Gilbert 1979). Já os fatores intrínsecos são inerentes ao inseto e ao hospedeiro, como os compostos químicos das plantas. Dentre estes, as substâncias do metabolismo secundário geralmente restringem a variedade de hospedeiros que um inseto pode utilizar. Não há um par de espécies que tenha o mesmo perfil de metabólitos secundários e assim muitas espécies podem ser identificadas pela sua composição química. Apesar de existir um perfil químico característico de uma espécie, a composição e a concentração dos compostos secundários podem variar entre os tecidos de um indivíduo e entre os indivíduos de uma população (Berenbaum 1990).

As variações intraespecíficas na composição química das plantas são citadas como grandes responsáveis pelas diferenças na susceptibilidade a ataques de insetos nas populações de determinado hospedeiro (McKey 1979, Coley *et al.* 1985, Pereyra & Bowers 1988). Os fitófagos seriam capazes de perceber e discriminar pequenas variações químicas com facilidade (Simmonds 2001) e apenas parte da população do hospedeiro seria atacada (Jermy 1984, Bernays & Graham 1988). Mesmo entre plantas que crescem bem próximas, algumas podem ser altamente infestadas enquanto outras são pouco atacadas ou nem são predadas. A influência dos compostos químicos das plantas também pode ser indireta: eles podem ser tóxicos para predadores, parasitas e doenças que atacam os insetos, reduzindo indiretamente a mortalidade dos herbívoros (Cornell & Hawkins 2003).

As condições da planta hospedeira tornam-se ainda mais importantes em fitófagos endófagos, pois as larvas não têm mobilidade para trocar de ambiente. Fatores como pouca competição, disponibilidade de recursos e compatibilidade química são avaliados por sinais químicos liberados pelas plantas e por outros insetos. A família Tephritidae é composta por várias espécies endófagas, cujas larvas se desenvolvem em partes vegetativas, flores e frutos do hospedeiro. Os Tephritidae endófagos de capítulos são bastante especializados. Nestes insetos, a utilização de capítulos depende de adaptações muito específicas à morfologia, química e fenologia da planta hospedeira, que em geral impedem o uso de plantas muito diferentes (Straw 1989).

Tomoplagia reticulata é um tefritídeo especialista em *Eremanthus glomerulatus*. Indivíduos adultos ovipõem nas inflorescências da planta hospedeira, onde as larvas se desenvolvem. O histórico de coletas de *T. reticulata* mostra uma grande variação na quantidade de insetos infestando cada indivíduo de *E. glomerulatus*, mesmo entre plantas de uma mesma moita (Abreu 2003). Esta variação pode ser um indício da preferência dos insetos por uma determinada planta, que apresenta condições adequadas para o desenvolvimento da prole ou apenas um acontecimento incidental.

Os objetivos deste capítulo foram descrever a variabilidade genética e química de *E. glomerulatus* e compará-las entre plantas com diferentes níveis de infestação por *T. reticulata*, a fim de verificar se a variação no número de herbívoros nas populações do hospedeiro é associada a algum atributo químico e/ou genético das plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

Eremanthus glomerulatus

Eremanthus glomerulatus (Asteraceae, Lychnophorinae) é uma espécie com flores andróginas, cuja floração e frutificação ocorrem de março a outubro (MacLeish 1987). Apresenta dispersão anemocórica e não forma banco de sementes (Velten & Garcia 2007). A distribuição dos frutos na borda externa da copa facilita a dispersão dos aquênios pelo vento, graças a uma estrutura

denominada “pappus”. *E. glomerulatus* apresenta porte arbustivo, geralmente encontradas em grandes colônias, e uma distribuição naturalmente fragmentada. Ela ocupa uma ampla distribuição geográfica mas, dentro de uma região, é restrita a algumas áreas de vegetação específica, onde os fragmentos de vegetação são separados uns dos outros por diferentes altitudes (MacLeish 1987).

Coleta dos indivíduos

As coletas foram realizadas nos municípios de Santana do Riacho, Lavras, Luminária, São Tomé das Letras e Carrancas em Minas Gerais, em 2004 (figura 1). Nome, tamanho e localização das amostras estão resumidos na tabela 1. Indivíduos com as mesmas coordenadas geográficas foram coletados dentro de uma mesma mancha. Um grupo de plantas foi considerado de uma mesma mancha se houvesse menos de 20m de distância entre elas. O número de indivíduos em uma mancha variou de 5 a centenas.



Figura 1: Localização geográfica dos municípios amostrados.

Tabela 1: Localidades de coleta e quantidade de adultos de *T. reticulata* (N) por indivíduo de *E. glomerulatus*.

População	Planta amostrada	Localidade	Coordenadas	(N)	(N)/população
ST (7)	AGA-1	São Tomé	21°42'39,4"S 44°56'37,9"W	0	16
	AGA-2	São Tomé	21°42'39,4"S 44°56'37,9"W	1	
	AGA-8	São Tomé	21°43'14,8"S 44°59'53,8"W	8	
	AGA-9	São Tomé	21°43'14,8"S 44°59'53,8"W	5	
	AGA-10	São Tomé	21°43'14,8"S 44°59'53,8"W	0	
	AGA-11	São Tomé	21°43'14,8"S 44°59'53,8"W	0	
	AGA-12	São Tomé	21°43'14,8"S 44°59'53,8"W	2	
LU (5)	AGA-3	Luminária	21°31,89'S 44°50,792'W	29	35
	AGA-4	Luminária	21°31,89'S 44°50,792'W	1	
	AGA-5	Luminária	21°31,89'S 44° 50,792'W	0	
	AGA-6	Luminária	21°31,89'S 44°50,792'W	4	
	AGA-7	Luminária	21°31,89'S 44°50,792'W	1	
LA (8)	AGA-13	Lavras	21°19'43,1"S 44°58'19,8"W	1	127
	AGA-14	Lavras	21°19'43,1"S 44°58'19,8"W	50	
	AGA-15	Lavras	21°19'43,1"S 44°58'19,8"W	2	
	AGA-16	Lavras	21°19'43,1"S 44°58'19,8"W	4	
	AGA-17	Lavras	21°19'43,1"S 44°58'19,8"W	4	
	AGA-18	Lavras	21°19'42,2"S 44°58'23,6"W	19	
	AGA-19	Lavras	21°19'42,2"S 44°58'23,6"W	23	
	AGA-20	Lavras	21°19'40,6"S 44°58'6,3"W	24	
CA (7)	AGA-21	Carrancas	21°26'49,4"S 44°39'29,4"W	22	44
	AGA-22	Carrancas	21°26'49,4"S 44°39'29,4"W	11	
	AGA-23	Carrancas	21°26'45,8"S 44°40'30,5"W	0	
	AGA-24	Carrancas	21°26'45,8"S 44°40'30,5"W	4	
	AGA-25	Carrancas	21°26'45,8"S 44°40'30,5"W	1	
	AGA-26	Carrancas	21°26'45,8"S 44°40'30,5"W	3	
	AGA-27	Carrancas	21°26'45,8"S 44°40'30,5"W	3	
SR (21)	AGA-28	Santana do Riacho	19°17'56,7"S 43°36'8,2"W	1	557
	AGA-29	Santana do Riacho	19°17'56,7"S 43°36'8,2"W	1	
	AGA-30	Santana do Riacho	19°17'56,7"S 43°36'8,2"W	12	
	AGA-31	Santana do Riacho	19°17'56,9"S 43°36'7,6"W	3	
	AGA-32	Santana do Riacho	19°17'56,9"S 43°36'7,6"W	0	
	AGA-33	Santana do Riacho	19°17'56,9"S 43°36'7,6"W	0	
	AGA-34	Santana do Riacho	19°17'56,9"S 43°36'7,6"W	16	
	AGA-35	Santana do Riacho	19°17'56,9"S 43°36'7,6"W	1	
	AGA-36	Santana do Riacho	19°17'59,8"S 43°36'8,5"W	2	
	AGA-37	Santana do Riacho	19°16'43,6"S 43°35'4,3"W	1	
	AGA-38	Santana do Riacho	19°16'43,6"S 43°35'4,3"W	12	
	AGA-39	Santana do Riacho	19°16'43,6"S 43°35'4,3"W	8	
	AGA-40	Santana do Riacho	19°16'43,6"S 43°35'4,3"W	7	
	AGA-41	Santana do Riacho	19°17'28,8"S 43°36'6,4"W	76	
	AGA-42	Santana do Riacho	19°17'28,8"S 43°36'6,4"W	60	
	AGA-43	Santana do Riacho	19°17'28,8"S 43°36'6,4"W	6	
	AGA-44	Santana do Riacho	19°17'28,8"S 43°36'6,4"W	3	
	AGA-45	Santana do Riacho	19°17'28,8"S 43°36'6,4"W	14	
	AGA-46	Santana do Riacho	19°17'28,8"S 43°36'6,4"W	90	
	AGA-47	Santana do Riacho	19°17'28,8"S 43°36'6,4"W	88	
	AGA-48	Santana do Riacho	19°17'27,1"S 43°36'6,3"W	156	
					Total =779

Foram coletadas folhas jovens dos mesmos indivíduos de *E. glomerulatus* de onde foram retirados capítulos para a amostragem de *T. reticulata*. Uma parte das folhas foi acondicionada imediatamente após a coleta em frascos com metanol e mantidas em congelador a -4°C até a análise química. A outra parte foi mantida em nitrogênio líquido até o momento das análises moleculares. Para quantificar o grau de infestação, foram coletados capítulos dos indivíduos de *E. glomerulatus* amostrados para as análises química e genética. O volume de inflorescências coletadas foi padronizado. Os capítulos foram acondicionados em potes plásticos com tampa telada, até que os adultos de *T. reticulata* emergissem.

Isozimas

Pequenos pedaços de tecido foliar foram triturados em 50 µl tampão de extração (Tris 0,1M, sacarose 0,2M, PVP 0,6%, EDTA 1mM, BSA 0,15%, DIECA 0,06M, BORAX (Na₂B₄O₇) 0,03M e β- mercaptoetanol 0,2%, pH 7,0; modificado de Sun & Ganders 1990). Em cada macerado foram colocados 3 retângulos de 10 x 4 mm de papel Whatman #3, que foram aplicados em géis de amido Sigma 8,5%.

Os sistemas-tampão utilizados estão na tabela 2 e as enzimas testadas na tabela 3. Após a eletroforese os géis foram cortados e incubados a 37°C, em solução de coloração (Shaw & Prasad 1970). Após a coloração os géis foram fixados em uma mistura de metanol, água e ácido acético glacial (5:5:1). Depois de fixados, os géis são fotografados para registro e diafanizados em glicerina 5%.

Tabela 2: Sistemas e condições de corrida utilizados para *E. glomerulatus*.

	Sistema B 180V	Sistema C 30mA	Sistema D 50mA
Solução eletrodo	H ₃ BO ₃ 0,3 M NaOH 60 mM HCl até pH 8,0	LiOH 10 mM H ₃ BO ₃ 90 mM EDTA 3mM	H ₃ BO ₃ 0,3 M NaOH 60 mM HCl até pH 8,0
Gel	Tris 10 mM HCl até pH 8,5	Solução eletrodo diluída 1:10	Tris 38 mM Ác. cítrico 2,5 mM

Tabela 3: Enzimas e sistemas em que a eletroforese de indivíduos de *E. glomerulatus* foi realizada.

Referência (EC)	Enzima (abreviação)	Sistema
3.4.11.1	Aminopeptidase da leucina (LAP)	(C)
1.6.2.2	Diaforase (DIA)	(B)
1.1.1.8	Desidrogenase do glicerol-3-fosfato (G3PDH)	(D)
1.1.1.42	Desidrogenase do isocitrato (IDH)	(D)
1.1.1.37	Desidrogenase do malato (MDH)	(D)
1.1.1.40	Enzima málica (ME)	(B)
3.1.1.1	Esterase (EST α)	(B)
5.4.2.2	Fosfoglicomutase (PGM)	(C)
4.2.1.2	Fumarase (FUM)	(C)
1.4.1.2	Desidrogenase do glutamato (GDH)	(C)
5.3.1.9	Isomerase da glicose-fosfato (PGI)	(C)
1.1.1.25	Desidrogenase do xiquimato (SKDH)	(D)
1.1.1.49	Desidrogenase da glicose-6-fosfato (G6PDH)	(D)
3.1.3.2	Fosfatase ácida (ACPH)	(B)
2.7.4.3	Adenilato quinase (AK)	(C)
3.4.11	Peptidase da leucina-alanina (PEP)	(B)

Química

A região característica dos sesqui e diterpenos (figuras 2 e 3, Patitucci *et al.* 1995) foi a escolhida para a análise. Os compostos foram inicialmente extraídos em metanol com o auxílio do Politron. O extrato obtido foi filtrado e o resíduo deixado por 24h em um frasco com 20 ml de hexano. Fez-se uma nova extração da fração metanólica com hexano e a solução resultante foi fracionada num funil de separação. A fração hexânica desta etapa foi unida ao resíduo inicial e filtrada. O volume desta solução foi reduzido em rotaevaporador a 40°C. O extrato foi analisado por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa (GC-MS) em um cromatógrafo Hewlett Packard 6890. As condições de injeção, adaptadas de Adams (1995), foram: temperatura de injeção, 240°C; temperaturas da coluna, 60°C-300°C, 3°C/min, 300°C; injeção sem divisão (*splitless*) durante 1,50 minutos; gás de arraste He 1mL/min, fluxo constante; volume injetado de cada amostra, 0,2 ou 1mL.

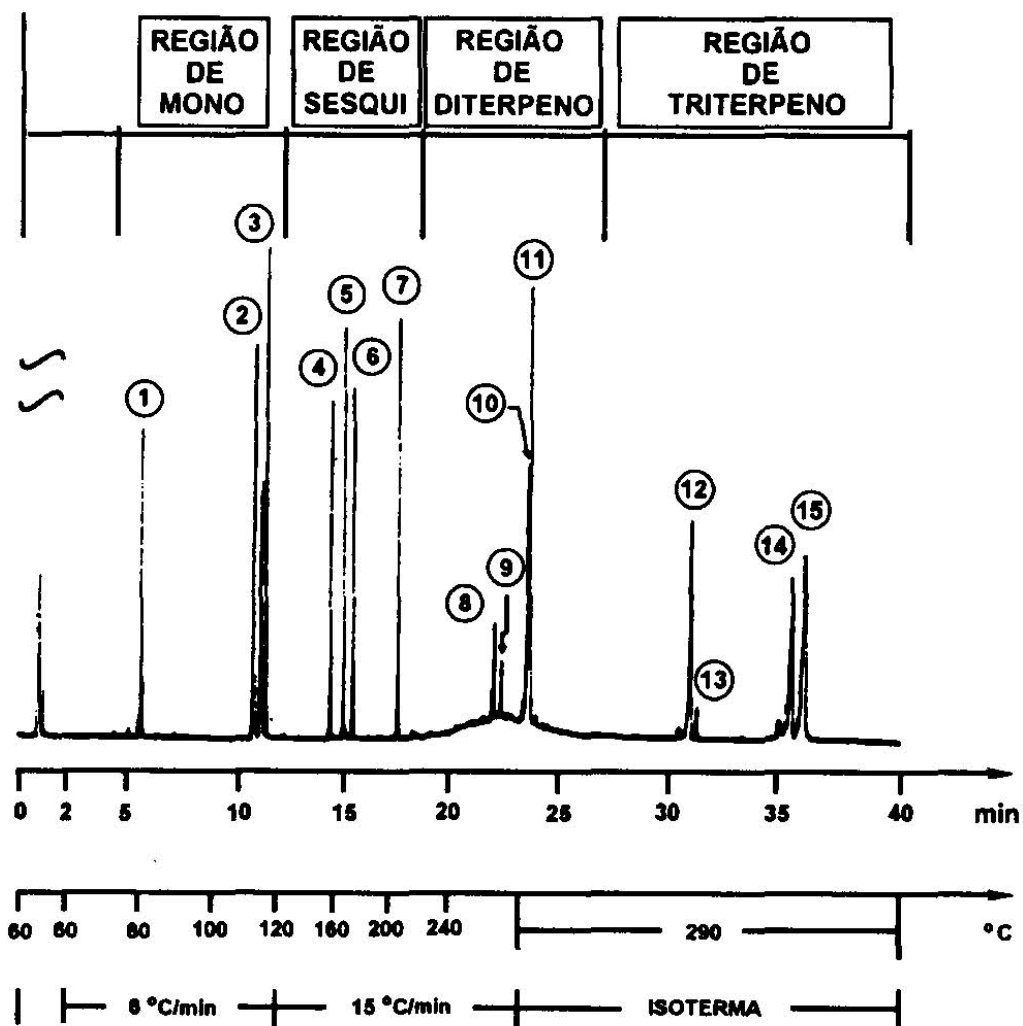


Figura 2: Cromatograma padrão para a detecção de terpenos, retirado de Patitucci *et al.* (1995). 1-3 referem-se a monoterpênos, 4-7 a sesquiterpênos, 8-11 a diterpênos e 12-15 a triterpênos.

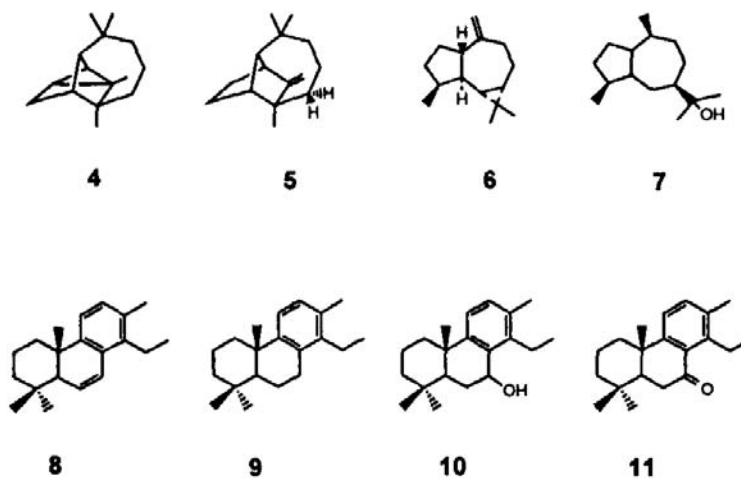


Figura 3: Detalhe dos sesqui- (4-7) e diterpênos (8-11) apresentados na figura 2, retirado de Patitucci *et al.* (1995).

Análises utilizadas

Isozimas

As frequências gênicas foram avaliadas pela leitura direta dos géis. As estimativas de variabilidade genética (número de locos polimórficos, heterozigosidades observada e esperada, riqueza de alelos) foram calculadas no programa GENETIX 4.05.2 (Belkhir *et al.* 2004). Os estimadores da estatística F (θ e f – Weir & Cockerham 1984) foram calculados no programa GENETIX 4.05.2 (Belkhir *et al.* 2004). Testes para verificar desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (por teste exato) e desequilíbrio de ligação foram feitos no programa GENEPOP 3.3 (Raymond & Rousset 1995). Nos testes múltiplos, as probabilidades foram corrigidas pelo número de testes feitos segundo Rice (1989). Foi construído um dendrograma usando como distância, Nei (1972) e como método de agrupamento, *neighbor-joining*, com confiabilidade dos ramos avaliada por *bootstrapping* (1000 replicações), serão calculados no pacote PHYLIP, ver. 3.6 (Felsenstein 1989) e visualizada no programa TREEVIEW (Page 1996).

O teste de Mantel foi feito para verificar se havia correlação entre as distâncias genéticas (F_{ST} par a par) e geográficas. Os valores de F_{ST} foram transformados em $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ e plotados contra as distâncias geográficas em uma dimensão (Rousset 1997). As matrizes de distância genética e geográfica foram permutadas 10.000 vezes no programa GENEPOP 3.3 (Raymond & Rousset 1995).

Química

Para cada composto foi calculado o seu índice de retenção (IR), de acordo com van den Dool & Kratz (1963). Para cada indivíduo de *E. glomerulatus*, foi feito um perfil de presença e ausência e de quantidade relativa de sesquiterpenos. Utilizando-se os dados quantitativos, foi calculado o índice de Shannon para todas as populações e foi feita uma análise de agrupamento, utilizando-se a distância euclidiana média e variância mínima como método de agrupamento (Ward 1963). A confiabilidade dos ramos foi avaliada por p-valor aproximadamente não-enviesado (AU),

que é um valor mais acurado que os valores de probabilidade por bootstrap (BP). A reamostragem foi feita com o auxílio dos pacotes *pvclust* (Suzuki & Shimodaira 2006) e *ape* (Paradis *et al.* 2004) do programa R (<http://www.r-project.org/>).

Relação planta-parasita

Foi feita uma análise de agrupamento, com variância mínima como método de agrupamento (Ward 1963), utilizando-se dados genéticos e químicos de cada indivíduo de *E. glomerulatus*. Verificou-se se havia relação entre o padrão de agrupamento e a quantidade de parasitas (*T. reticulata*) presente no organismo (tabela 1). Como método complementar, foi feita uma análise de coordenadas principais (PCO) com a mesma matriz de distância euclidiana usada na análise de agrupamento. Na análise química, os dados foram transformados em arco seno antes de serem analisados.

RESULTADOS

Isozimas

Foram observados nove locos polimórficos nas 5 populações analisadas: LAP-1, EST, GDH-1, ACPH, DIA, PGM, G6PDH, IDH, e SKDH. Quatro alelos foram encontrados somente em populações SR (alelos ACPH⁵, PGM⁵, GDH³ e GDH⁵) mas nenhum foi encontrado somente em populações do Sul. Os alelos privados foram PGM³ em ST e SKDH³ em CA (tabela 4).

A diversidade genética (H_E) média foi 0,125 (tabela 5). Não foi observado desequilíbrio de ligação. Os locos DIA e G6PDH apresentaram desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Todos os valores de f foram positivos e a média das populações foi 0,77.

Tabela 4: Distribuição das frequências alélicas nos locos polimórficos em *E. glomerulatus*.

Loco	Mobilidade relativa	São Thomé	Lavras	Carrancas	Luminárias	Santana do Riacho
<u>LAP-1</u>	(N)	7	8	7	5	19
	4	0,571	0,625	1,000	0,800	0,947
	5	0,429	0,375	-	0,200	0,053
<u>EST</u>	(N)	7	8	7	5	21
	3	0,143	-	-	-	0,143
	4	0,857	0,750	0,857	1,000	0,857
<u>GDH-1</u>	5	-	0,250	0,143	-	-
	(N)	7	8	7	5	21
	3	-	-	-	-	0,048
<u>ACPH</u>	4	1,000	1,000	1,000	1,000	0,905
	5	-	-	-	-	0,048
	(N)	7	8	7	5	21
<u>DIA</u>	4	1,000	0,875	0,857	1,000	0,810
	5	-	0,125	0,143	-	0,190
	(N)	7	8	7	5	20
<u>PGM</u>	1	-	0,125	0,071	0,100	0,075
	2	0,571	-	-	0,200	0,150
	3	0,071	-	-	0,200	-
<u>G6PDH</u>	4	0,357	0,875	0,929	0,500	0,625
	5	-	-	-	-	0,150
	(N)	2	5	6	5	9
<u>IDH</u>	3	-	-	0,333	-	0,111
	4	1,000	0,800	0,500	0,600	0,556
	5	-	0,200	0,167	0,400	0,333
<u>SKDH</u>	(N)	3	8	6	5	8
	4	0,667	0,750	1,000	1,000	0,375
	5	0,333	0,250	-	-	0,625
	(N)	4	8	7	5	5
	3	-	-	0,071	-	-
	4	0,500	1,000	0,786	0,800	1,000
	5	0,500	-	0,143	0,200	-

Tabela 5: Estimativas de variabilidade genética (**A**: número médio de alelos por loco; **P**: % de locos polimórficos a 95%; **H_O**: heterozigosidade média observada; **H_E**: heterozigosidade média esperada; desvios-padrão entre parênteses) e endocruzamento (*f*, NS: valores não significativos) nas populações de *E. glomerulatus*.

População	A	P%	H _E	H _O	<i>f</i>
São Thomé	1,4	37,5	0,163 (0,230)	0,062 (0,194)	0,69
Lavras	1,4	37,5	0,123 (0,174)	0,016 (0,062)	0,89
Carrancas	1,2	18,7	0,065 (0,152)	0,021 (0,057)	0,73
Santana do Riacho	1,7	43,7	0,157 (0,210)	0,028 (0,112)	0,83
Luminárias	1,4	31,2	0,116 (0,194)	0,062 (0,193)	0,54
Média	1,42	33,8	0,125	0,037	0,77

O valor de θ entre cidades foi 0,09 (0,010-0,017) enquanto a diferenciação entre regiões não foi significativa. As distâncias genéticas não foram correlacionadas com as distâncias geográficas (teste de Mantel, $r=-0,00005$, $p>0,05$). A distância genética média foi de 0,029, variando de 0,003 a 0,049. No dendrograma (figura 2), a população de Santana do Riacho ficou no ramo mais externo e as populações do Sul nos ramos mais internos. Não foi possível definir a relação entre as populações do Sul pois os ramos internos não foram consistentes.

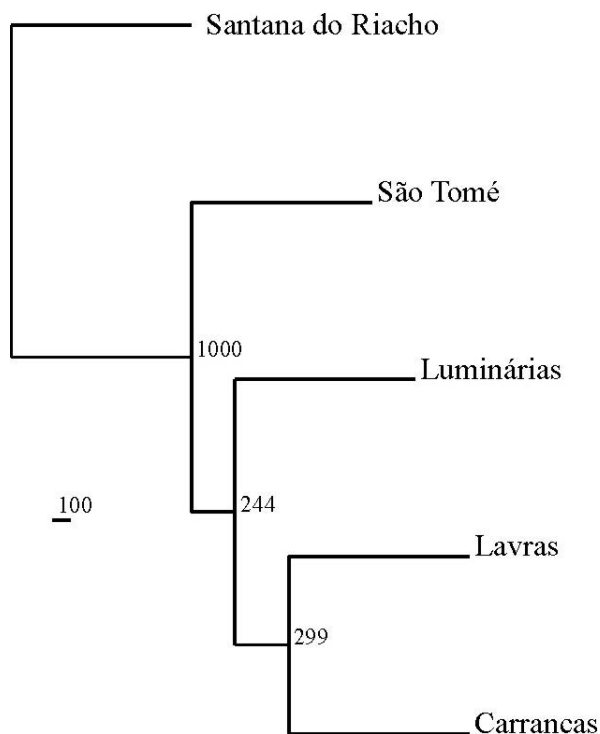


Figura 2: Dendrograma das populações de *E. glomerulatus* gerado pelo método de *neighbor-joining*, baseado na distância genética de Nei (1972). Nos nós, estão os valores de *bootstrap*.

Química

Na análise química, foram encontrados 57 compostos na região característica dos sesqui e diterpenos (anexo 1). Destes, sete foram encontrados em todos os indivíduos. As populações apresentaram índices de diversidade bem próximos (tabela 6) e estes não foram correlacionados

com o tamanho amostral ($p=0,3$). O dendrograma agrupou num ramo as populações São Tomé e Luminárias e no outro Lavras, Santana do Riacho e Carrancas (figura 3).

Tabela 6: Índice de diversidade de Shannon baseado na presença e ausência de terpenos em populações de *E. glomerulatus*.

População	N	Índice de Shannon
São Thomé	7	3,06
Luminárias	5	2,95
Lavras	8	3,22
Carrancas	6	3,26
Santana do Riacho	20	3,28

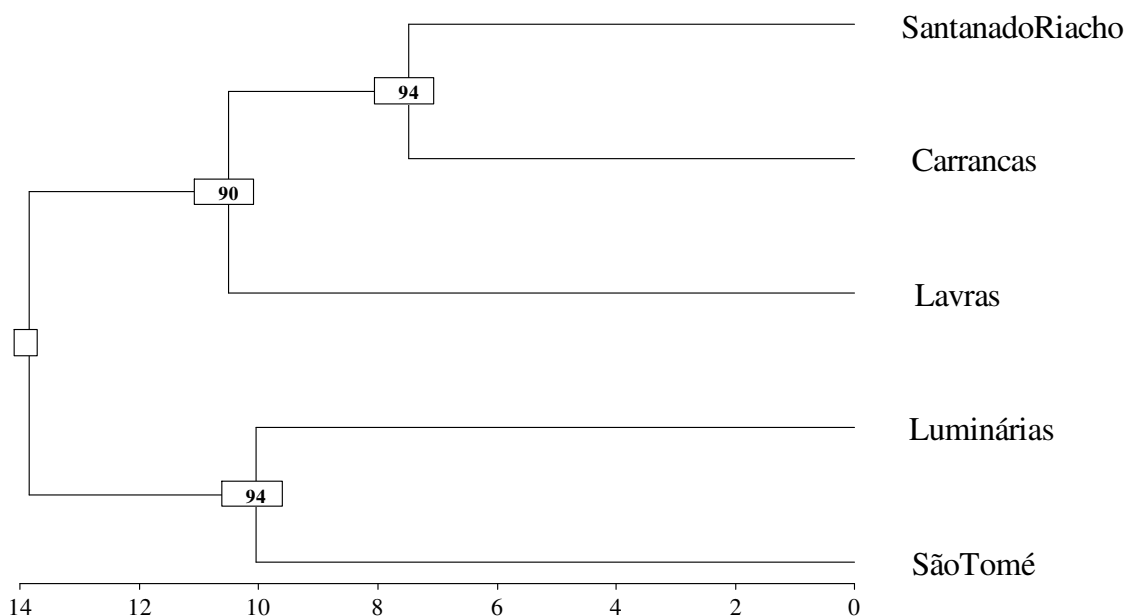


Figura 3: Análise de agrupamento dos dados químicos quantitativos de *E. glomerulatus*, usando distância euclidiana e variância mínima (Ward 1963). Nos nós, os valores de p-valor aproximadamente não-enviesado (AU).

Relação planta-parasita

A infestação média foi de 16,23 ($S^2=923,23$) insetos adultos de *T. reticulata* por planta. Plantas de SR foram mais atacadas que plantas SM; a infestação média em SM foi 8,22 ($S^2=145,02$) e em SR, 26,52 ($S^2=1784,86$). Não houve nenhum padrão de agrupamento utilizando tanto dados químicos (figuras 4 e 6) quanto genéticos (figuras 5 e 7). Em outras palavras, os ramos terminais não agruparam os indivíduos nem por localidade nem por presença de parasitas. Para verificar a

consistência deste resultado, outros métodos de agrupamento (UPGMA, ligação mínima – dados não apresentados) foram usados e obtivemos os mesmos resultados.

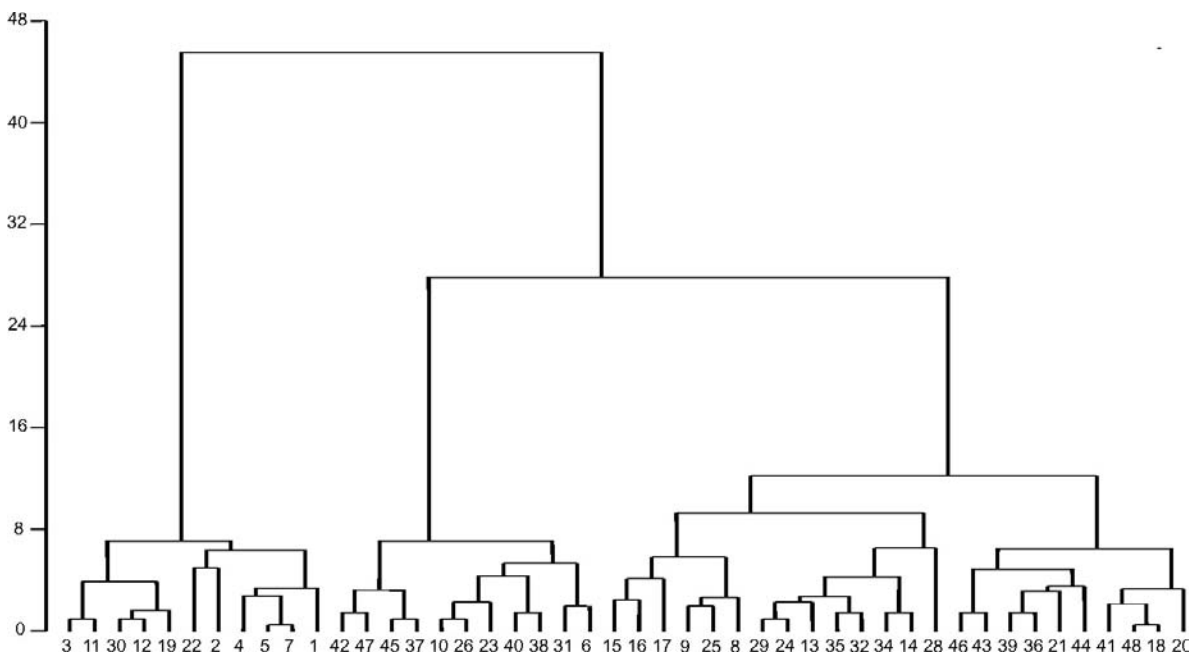


Figura 4: Análise de agrupamento, usando variância mínima, entre os 46 indivíduos de *E. glomerulatus* analisados quimicamente.

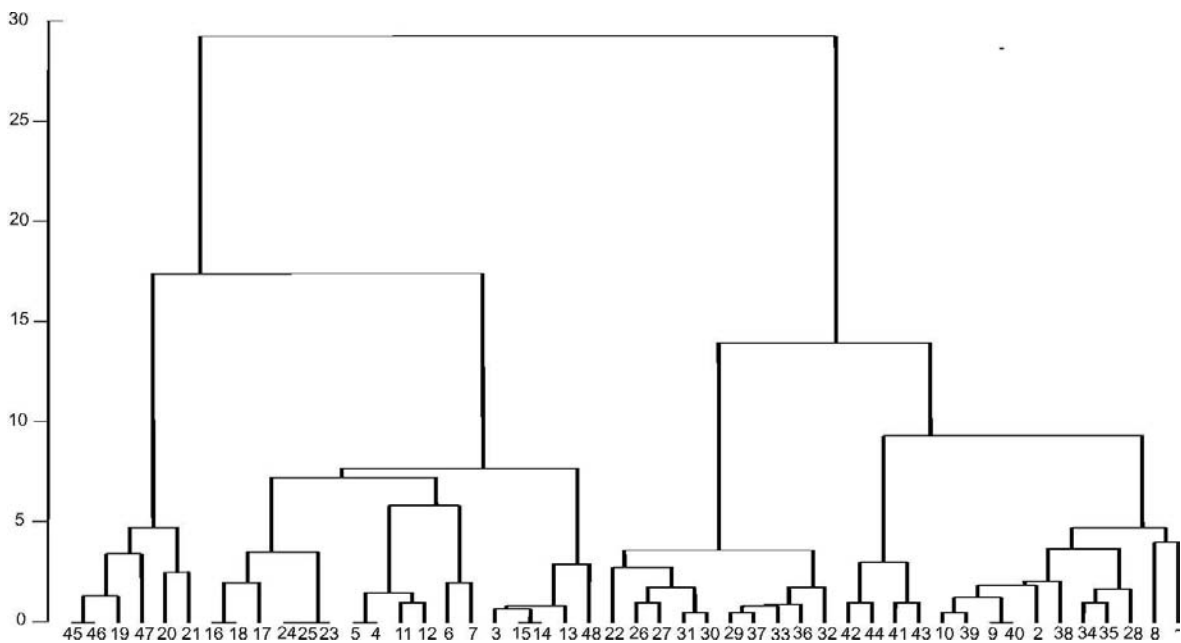


Figura 5: Análise de agrupamento, usando variância mínima, entre os 48 indivíduos de *E. glomerulatus* analisados geneticamente.

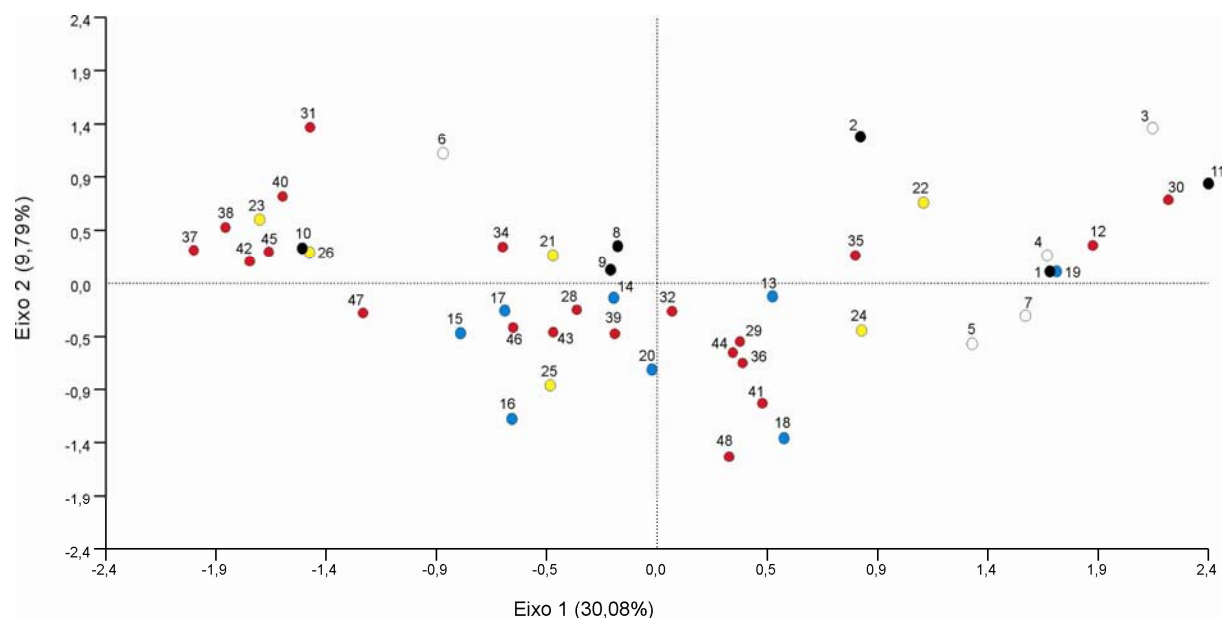


Figura 6: Análise de coordenadas principais da composição química dos 46 indivíduos de *E. glomerulatus* analisados. Círculos pretos referem-se a indivíduos de São Tomé, brancos de Luminárias, azuis de Lavras, amarelos de Carrancas e vermelhos de Santana do Riacho.

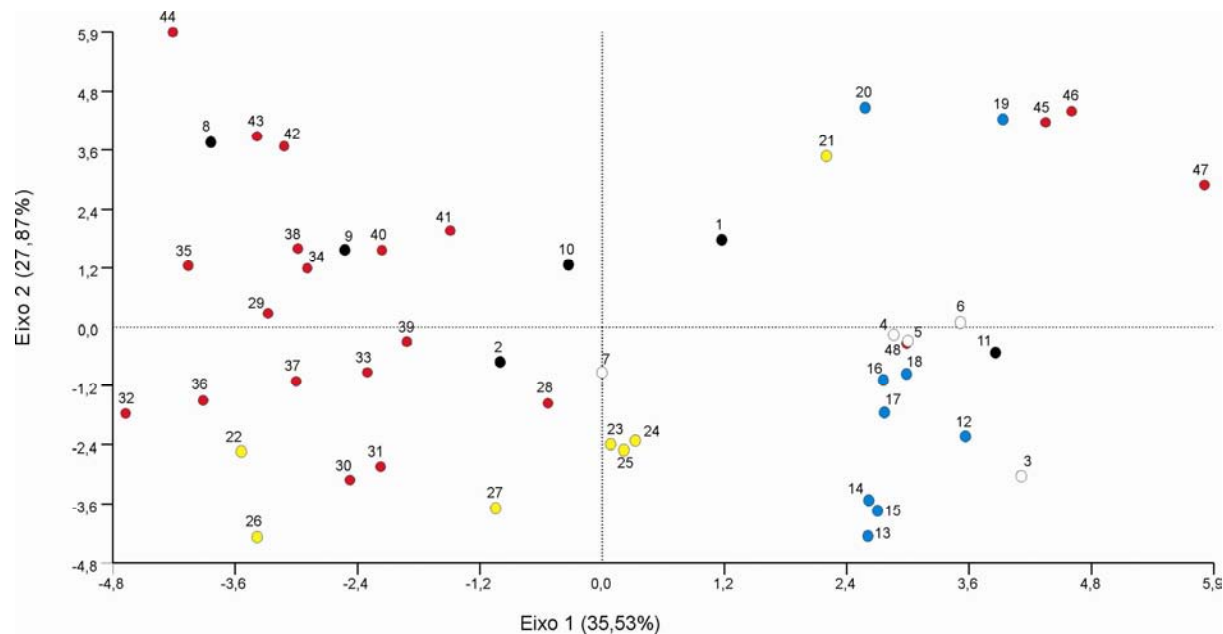


Figura 7: Análise de coordenadas principais da composição genética dos 48 indivíduos de *E. glomerulatus* analisados. Círculos pretos referem-se a indivíduos de São Tomé, brancos de Luminárias, azuis de Lavras, amarelos de Carrancas e vermelhos de Santana do Riacho.

DISCUSSÃO

Variabilidade genética em *E. glomerulatus*

Os níveis de variabilidade e estruturação genética de uma espécie são altamente dependentes de características de história de vida e de história populacional. Em uma revisão de estudos de isozimas em plantas, Hamrick & Godt (1989) encontraram que o padrão de distribuição geográfica e o sistema de cruzamento são os principais determinantes do nível de variabilidade de uma espécie. Espécies com distribuição restrita, por exemplo, teriam menos variabilidade genética que espécies de distribuição mais ampla. Isto se deve ao pequeno tamanho das populações, naturalmente fragmentadas, que as torna mais susceptíveis aos efeitos da deriva genética.

E. glomerulatus pertence à subtribo Lychnophorinae, cujos membros apresentam um alto grau de endemismo. O padrão de baixa variabilidade genética em espécies com distribuição restrita ($H_E=0,063$, Hamrick & Godt 1989) foi observado nesta subfamília, com exceção de *Lychnophora* (tabela 7). *E. glomerulatus* apresentou uma variabilidade genética ($H_E=0,125$) maior que *Proteopsis* e *Minasia* mas menor que *Lychnophora* (tabela 7). Há indícios de que *Lychnophora* forme banco de sementes, o que contribuiria para uma maior diversidade nas espécies deste gênero (Azevedo 2004). Os gêneros *Minasia* e *Proteopsis* são compostos por espécies de distribuição extremamente restrita, descrita como micro-endêmica. Essas populações seriam menores que as de *E. glomerulatus* e sofreriam os efeitos da deriva mais intensamente, o que justificaria a menor variabilidade observada nestes gêneros.

Tabela 7: Variabilidade genética em outras espécies de Lychnophorinae.

Espécie	F_{ST}	H_E
<i>Lychnophora nanuzae</i> ^a	0,046	0,256
<i>Lychnophora ramosissima</i> ^a	0,221	0,237
<i>Lychnophora rupestris</i> ^a	0,113	0,197
<i>Lychnophora granmogolense</i> ^a	0,216	0,153
<i>Minasia pereirae</i> ^b	0,041	0,035
<i>Minasia alpestris</i> ^b	0	0,046
<i>Minasia scapigera</i> ^b	0	0,079
<i>Minasia cabralensis</i> ^b	0,621	0,080
<i>Proteopsis argentea</i> ^c	0,300	0,058

^aAzevedo 2004, ^bJesus *et al.* 2009, ^cJesus *et al.* 2001.

Além de baixa variabilidade, espécies de distribuição restrita apresentam uma grande diferenciação entre as populações ($F_{ST}=0,248$, Hamrick & Godt 1989). Entretanto, houve pouca estruturação entre as populações de *E. glomerulatus* (0,09). Alguns autores sugerem que o sistema de cruzamento e o modo de dispersão dos frutos e sementes seriam as características com maior influência sobre os níveis de estruturação populacional de espécies de plantas (Edwards & Wyatt 1994, Purdy *et al.* 1994). Já foi observado que em espécies anemocóricas, como *E. glomerulatus*, há maior fluxo gênico entre as populações em ambientes fragmentados (e.g. Young *et al.* 1996, Ballal *et al.* 1994). Foré *et al.* (1992), por exemplo, compararam a divergência genética em *Acer saccharum* antes e depois da fragmentação. Eles observaram uma redução na estruturação após a fragmentação, atribuída a um maior fluxo gênico devido à alteração das correntes de vento. Já foi demonstrado que a fragmentação aumenta a velocidade do vento nas bordas dos fragmentos e assim pode aumentar a transferência de pólen e sementes (Saunders *et al.* 1991). Além disso, os efeitos de uma fragmentação recente mais intensa podem ainda não ser percebidos na estrutura genética, já que *E. glomerulatus* é uma planta com um longo tempo de geração. A baixa estruturação pode refletir um fluxo gênico histórico, que ocorreu entre as regiões em uma época onde a distribuição da planta era mais contínua.

Todas as populações apresentaram indícios de endogamia, dados os altos valores de *f*. Os níveis de endogamia variam em função do tipo de distribuição da planta, da forma de polinização e do sistema de reprodução. Não existem estudos de biologia floral em *E. glomerulatus* mas espécies próximas são polinizadas por abelhas. Abelhas exploram a maioria dos recursos disponíveis em uma inflorescência antes de voar para a próxima, restringindo o fluxo gênico a indivíduos próximos, o que pode proporcionar o cruzamento entre indivíduos aparentados (endogamia biparental). Caso a planta seja auto-compatível, ainda pode ocorrer auto-fecundação (endogamia uniparental). Apesar de um sistema de auto-incompatibilidade existir em 50% das angiospermas, incluindo Asteraceae, várias espécies dentro destas famílias fazem auto-fecundação (de Nettancourt 2001).

As plantas são similares entre si. O padrão de agrupamento dos ramos refletiu a distância geográfica entre as populações: a população de Santana do Riacho ficou no ramo mais externo e as populações do Sul se agruparam no outro.

Variabilidade química em *E. glomerulatus*

Houve pouca variabilidade química tanto entre indivíduos de uma população quanto entre populações, e esta foi bem menor que a variabilidade genética. Como a maior parte da variabilidade observada em isozimas geralmente é neutra, esperava-se que nem toda a diversidade genética fosse refletida em variabilidade fenotípica. Ademais, os locos controlando a variação destes caracteres podem não ter ligação com os locos enzimáticos estudados. Isozimas são co-dominantes e codificadas por um número limitado de locos (Weeden & Wendel 1989), enquanto que um único gene pode codificar vários terpenos (Vogel *et al.* 1996). Além do fator genético, a produção de compostos secundários também é determinada pelo ambiente e pela interação entre genética e ambiente. A síntese de terpenóides pode mudar, por exemplo, durante o desenvolvimento da planta, sob pressão de herbivoria (Sturgeon 1979, Langenheim 1994) ou devido a diferentes condições ambientais (Figueiredo *et al.* 1997, Robles & Garzino 2000).

A concordância entre a variação genética e de terpenóides entre populações já foi observada (Adams *et al.* 2003, Khanuja *et al.* 2005) mas a relação entre as duas variáveis permanece inadequadamente definida (Vogel *et al.* 1996, Adams *et al.* 2003). Apesar de Hannover (1992) dar evidências de que os quimiotipos de terpeno são fortemente controlados por fatores genéticos, ele também relatou eventos de variação ambiental na expressão destes compostos sob condições ambientais extremas. A influência de fatores ambientais na composição química de óleos essenciais também foi relatada em Asteraceae (Haider *et al.* 2004, Curado *et al.* 2006). Já Osier & Lindroth (2001) encontraram uma grande influência genética na produção de glicosídeos fenólicos mas pequena em taninas condensadas. Desta forma, fatores ambientais poderiam ter uma maior influência do que o genótipo na similaridade química entre as populações desta espécie.

Provavelmente, fatores ambientais justificam a presença de Santana do Riacho no mesmo ramo que Lavras e Carrancas. Apesar de localizar-se a mais de 200 Km de distância de qualquer outra população, Santana do Riacho deve compartilhar características abióticas com Lavras e Carrancas. Experimentos controlados poderiam determinar qual a contribuição relativa de genótipo e ambiente na variação observada.

Relação planta-parasita

A maioria dos insetos fitófagos ataca apenas uma parcela da população da planta hospedeira (Jermy 1984) mas as razões ecológicas e evolutivas por trás deste fato são, entretanto, bastante controversas. Os dados de infestação de tefritídeos de frutos se ajustam a uma distribuição binomial negativa, com a variância excedendo em muito a média de insetos por fruto (Mangan *et al.* 1997). Este mesmo padrão foi observado em nossos dados, o que sugere que a distribuição de adultos de *T. reticulata* em *E. glomerulatus* siga a mesma distribuição. Não houve padrão de agrupamento das plantas em relação à presença de parasitas, nem na análise genética nem na química.

A variação genética na concentração e tipo de terpenóides produzidos por uma espécie ocorre em várias plantas e muitas vezes é associada à herbivoria. Em *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, foi observada a variação genética na produção de metabólitos secundários em resposta à herbivoria, mas somente para interações com fitófagos generalistas (Mosleh Arany *et al.* 2008). A variação genética pode não influir no desempenho de especialistas, como *T. reticulata*. Além disso, a variação que influencia no grau de parasitismo pode ser resultado de plasticidade fenotípica; um mesmo genótipo conferiria fenótipos diferentes dependendo de fatores ambientais bióticos e abióticos. Já foram relatados casos em que a resposta induzida pela presença de herbívoros era plástica (Callaway *et al.* 2003).

Uma consideração que deve ser feita é que a extração foi feita a partir das folhas de *E. glomerulatus* e *T. reticulata* parasita os capítulos desta planta. Pode haver algum composto que varie entre estas estruturas e seja primordial para a escolha do parasita. Terpenóides encontrados em

folhas também são encontrados em flores (ver Azuma *et al.* 1999) mas a maioria dos tefritídeos se especializa em estruturas de flores e frutos que não possuem os compostos secundários característicos da planta (Mitter & Farrell 1991). Além disso, muitas espécies acumulam maiores concentrações de metabólitos secundários defensivos nos órgãos reprodutivos do que nos vegetativos (Schoonhoven *et al.* 2005) e pode haver diferenças entre o perfil de terpenos presente em folhas de galhos vegetativos e de galhos com flores, como já observado para outra composta, *Artemisia tridentata* (Byrd *et al.* 1999). Por fim, a concentração foliar de metabólitos secundários varia ao longo das estações do ano (Osier *et al.* 2000, Riipi *et al.* 2002, Rehill *et al.* 2006). Assim, para realmente se avaliar a influência destes na comunidade de artrópodes seria necessário avaliar estas concentrações ao longo do tempo.

Os sesquiterpenos podem não ser os principais compostos de atração para este parasita, mesmo sendo altamente defensivos contra herbívoros (Harbone 2001). Uma enorme gama de compostos secundários pode exercer esse papel tanto em conjunto quanto isoladamente. Outro aspecto relevante é que a qualidade nutricional (substâncias do metabolismo primário) do capítulo também pode influenciar na escolha de um hospedeiro, e na posterior sobrevivência da larva. Açúcares como glicose e frutose (Girolami *et al.* 1986) e proteínas (Fontellas-Brandalha & Zucoloto 2004), por exemplo, estimulam a oviposição. Herbívoros podem responder também a pistas visuais e não-voláteis que diferem entre os indivíduos/populações mas que não tem relação com a produção de metabólitos secundários.

Outros fatores como interações biológicas, a fenologia do hospedeiro, microorganismos e fatores abióticos (*e.g.* condições micro-climáticas) podem influir na escolha de uma planta (Courtney & Kibota 1990). Mopper & Simberloff (1995), por exemplo, observaram que as plantas menos atacadas eram as que primeiro produziam folhas na primavera. A maior infestação observada em Santana do Riacho pode ser um indício de alguma condição ambiental favorável à infestação nesta região. Apesar de SR e SM apresentarem clima e vegetação parecidos, algum fator mais

específico, como temperaturas mínimas e máximas ou umidade podem favorecer a proliferação de *T. reticulata* em SR.

Assim, parece não haver relação entre o perfil químico e/ou genético individual em *E. glomerulatus* e a presença de *T. reticulata* em seus capítulos. Urzúa *et al.* (2007) também não acharam correlação entre a composição química de flores de duas compostas, *Haplopappus berterii* e *Chrysanthemum coronarium*, e as preferências dos visitantes, dentre eles uma espécie de tefritídeo (*Trupanea* sp). Talvez não haja diferenças significativas entre indivíduos saudáveis e parasitados e o que importa é simplesmente identificar a espécie de planta a ser parasitada. Por outro lado, características químicas e genéticas da planta podem ser apenas um dos mecanismos que, em conjunto, conduzem a interação entre parasita e hospedeiro. Como o número de insetos e a árvore mais povoada variam de ano para ano, isso sugere que as pressões seletivas variam sazonalmente. Em cochonilhas, a taxa de infestação apresentou correlação com variáveis ambientais, que independem do genótipo (Alstad 1998). Futuros estudos podem esclarecer que fatores abióticos proporcionam uma maior taxa de infestação de *E. glomerulatus* em Santana do Riacho.

Capítulo 2 – Padrões de diferenciação e diversidade genética em um fitófago especialista, *Tomoplagia reticulata*

INTRODUÇÃO

Insetos fitófagos representam um quarto de todos os organismos terrestres e esta grande diversidade é atribuída ao processo evolutivo de especialização nas plantas hospedeiras (Bernays & Chapman 1994). A relação de dependência que se estabelece entre inseto e planta limita a distribuição dos herbívoros à disponibilidade do hospedeiro (Dempster 1989). Esta dependência é mais crítica em especialistas que em generalistas pois a distribuição dos monófagos é limitada pela disponibilidade de uma única espécie de planta. Assim, habitats adequados são mais fragmentados para especialistas que para generalistas, o que reduz a coesão entre as populações de insetos, reduzindo o fluxo gênico. Conseqüentemente, espera-se que especialistas apresentem uma maior diferenciação genética que insetos com uma dieta mais ampla (Price 1980, Futuyma & Moreno 1988). Além disso, a redução do fluxo gênico pode causar uma diminuição da variabilidade genética nos especialistas, devido ao pequeno tamanho efetivo das populações (Slatkin & Voelm 1991, Ingvarsson & Olsson 1997). Generalistas, por outro lado, geralmente ocorrem em populações maiores e mais diversas e a sobreposição da distribuição dos vários hospedeiros cria uma distribuição mais contínua de plantas.

Em uma revisão sobre padrões de diferenciação genética em insetos herbívoros, Peterson & Denno (1998b) questionaram a hipótese de maior estruturação em especialistas. Os autores não encontraram relação entre a amplitude da dieta e o grau de estruturação de populações de fitófagos. Neste trabalho, entretanto, monófagos foram definidos como fitófagos que se alimentam em um único gênero de planta. Esta definição ainda permite a sobreposição da distribuição de diferentes espécies de plantas hospedeiras, como em generalistas. Assim, como eles mesmos sugerem, a relação talvez exista se forem estudados insetos estritamente monófagos,

ou seja, que se alimentem em apenas uma espécie de planta hospedeira. Apesar de poucos estudos terem focado em espécies estritamente monófagas, uma maior diferenciação em especialistas que em generalistas é geralmente encontrada (*e.g.* Gaete-Eastman *et al.* 2004).

Tephritidae é uma das famílias mais estudadas de fitófagos. Ela está distribuída nas regiões temperada, subtropical e tropical, com a maior diversidade ocorrendo nos trópicos (Headrick & Goeden 1998). A maioria dos estudos, entretanto, concentrou-se em espécies temperadas das subfamílias Dacinae e Trypetinae, que apresentam importância econômica. Elas usam os frutos carnosos de seus hospedeiros como fonte de alimento. Pouco se sabe sobre a outra subfamília, Tephritinae, que usa a parte vegetativa e as inflorescências dos hospedeiros como alimento para as larvas (Foote *et al.* 1993, Headrick & Goeden 1998).

Tomoplagia (Coquillett) é o gênero de Tephritinae mais abundante no Brasil (Prado *et al.* 2002). As fêmeas ovipõem nas inflorescências das compostas, onde as larvas endófagas se desenvolvem. *Tomoplagia reticulata* é uma espécie monófaga que parasita *Eremanthus glomerulatus* (Asteraceae). A distribuição deste fitófago é restrita ao estado de Minas Gerais, em áreas de ocorrência da planta hospedeira. *E. glomerulatus* é uma arvoreta encontrada em grandes colônias, na transição de vegetação campo rupestre-cerrado, cujas floração e frutificação ocorrem de março a outubro (MacLeish 1987).

O objetivo deste capítulo foi testar a hipótese de que fitófagos especialistas apresentam maior diferenciação genética e menor diversidade do que generalistas. Para isso, caracterizamos a variabilidade e a estrutura genética de um fitófago especialista, *T. reticulata*, e comparamos com o observado para outros fitófagos com diferentes amplitudes de hospedeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos indivíduos

As coletas foram realizadas em 2004 e 2005 em Minas Gerais (figura 1 e tabela 1). As populações amostradas nos municípios de Luminárias, Carrancas e Lavras foram consideradas como da região Sul de Minas (SM daqui em diante), e as populações amostradas no município de Santana do Riacho da região SR. Foram coletados capítulos de *Eremanthus glomerulatus*, que foram acondicionados em potes plásticos com tampa telada. Após emergirem, os adultos de *T. reticulata* foram alimentados com mel e água por 4 -5 dias e depois congelados em nitrogênio líquido. A genitália externa foi dissecada e preservada individualmente em frascos contendo solução de glicerina - etanol (1:1), para um registro morfológico das espécies.



Figura 1: Localização geográfica dos municípios amostrados.

Procedimentos de eletroforese

Os indivíduos inteiros foram macerados manualmente com um bastão de vidro em 30µl de solução de gel do "sistema A" (tabela 2). Em cada homogeneizado foram colocados 3 retângulos de 10 x 4 mm de papel Whatman #1, que foram aplicados em géis de amido Sigma 8,5%.

Tabela 1: Localidades de coleta e número de indivíduos amostrados e utilizados em isozimas.

	Código do hospedeiro	Localidade	Coordenadas	Isozimas	Total amostrado
SM	CA04-1	Carrancas	21°26'49,4"S 44°39'29,4"W	11	11
	CA05-1	Carrancas	21°26'45,4"S 44°40'36,7"W	10	11
	LA04-1	Lavras	21°19'43,1"S 44°58'19,8"W	31	51
	LA05-4			14	50
	LA05-1	Lavras	21°19'42,2"S 44°58'23,6"W	10	12
	LA05-2	Lavras	21°19'42,2"S 44°58'23,6"W	9	10
	LA05-3	Lavras	21°19'43,1"S 44°58'19,8"W	9	10
	LA05-5	Lavras	21°19'43,1"S 44°58'19,8"W	8	9
	LU05-1	Luminária	21°31'53"S 44°50'47"W	12	12
				Total = 114	Total = 166
SR	SR04-1	Santana do Riacho	19°17'56,7"S 43°36'8,2"W	11	12
	SR04-2	Santana do Riacho	19°16'43,6"S 43°35'4,3"W	12	12
	SR05-2			9	9
	SR04-3	Santana do Riacho	19°17'28,8"S 43°36'6,4"W	30	76
	SR04-4	Santana do Riacho	19°17'28,8"S 43°36'6,4"W	25	60
	SR04-5	Santana do Riacho	19°17'28,8"S 43°36'6,4"W	14	14
	SR04-6	Santana do Riacho	19°17'28,8"S 43°36'6,4"W	34	90
	SR04-7	Santana do Riacho	19°17'28,8"S 43°36'6,4"W	34	88
	SR04-8	Santana do Riacho	19°17'27,1"S 43°36'6,3"W	63	156
	SR05-1	Santana do Riacho	19°17'56,7"S 43°36'8,2"W	9	10
				Total = 241	Total = 527

Os sistemas-tampão utilizados estão na tabela 2. Após a eletroforese os géis foram cortados e incubados a 37°C em recipiente de plástico contendo solução de coloração (Shaw & Prasad 1970). As enzimas testadas e os sistemas usados em cada uma delas estão listados na tabela 3. Após a coloração os géis foram fixados em uma mistura de metanol, água e ácido acético glacial (5:5:1). Depois de fixados, os géis são fotografados para registro e diafanizados em glicerina 5%.

Tabela 2: Sistemas e condições de corrida utilizados em isozimas.

	Sistema A pH 8,6 / 50mA	Sistema B pH 8,5/180V	Sistema C pH 8,0 / 30mA
Solução eletrodo	Tris 0,34 M Ác. cítrico 78 mM	H ₃ BO ₃ 0,3 M NaOH 60 mM HCl até pH 8,0	LiOH 10 mM H ₃ BO ₃ 90 mM EDTA 3mM
Gel	Tris 38 mM Ác. cítrico 2,5 mM	Tris 10 mM HCl até pH 8,5	Solução eletrodo diluída 1:10

Tabela 3: Enzimas e sistemas em que a eletroforese de indivíduos de *T. reticulata* foi realizada.

Referência (EC)	Enzima (abreviação)	Sistema
1.2.3.1	Oxidase aldeídica (AO)	(A)
1.6.2.2	Diaforase (DIA)	(C)
1.1.1.30	Desidrogenase do 3-hidroxiubutirato (HBDH)	(B)
1.1.1.42	Desidrogenase do isocitrato (IDH)	(A)
1.1.1.37	Desidrogenase do malato (MDH)	(A)
1.1.1.40	Enzima málica (ME)	(A)
3.1.1.1	Esterase (EST α)	(B)
5.4.2.2	Fosfoglicomutase (PGM)	(A)
4.2.1.2	Fumarase (FUM)	(C)
1.4.1.3	Desidrogenase do glutamato (GDH)	(B)
5.3.1.9	Isomerase da glicose-fosfato (PGI)	(C)
3.4.11	Peptidase da leucina-alanina (PEP)	(B)

Análises utilizadas

As frequências gênicas foram avaliadas pela leitura direta dos géis. As estimativas de variabilidade genética (número de locos polimórficos, heterozigosidades observada e esperada, número de alelos por loco) e a distância genética entre as populações (Nei 1978) foram calculadas no programa GENETIX 4.05.2 (Belkhir *et al.* 2004). O teste de Spearman foi usado para avaliar se havia correlação entre as estimativas de variabilidade e o tamanho amostral. As estimativas de variabilidade foram comparadas entre regiões e entre anos de coleta através de um teste Mann-Whitney (Zar 1996). Os estimadores da estatística F , θ para F_{ST} e f para F_{IS} (Weir & Cockerham 1984), foram calculados no programa GENETIX 4.05.2 (Belkhir *et al.* 2004). Testes para verificar desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (por teste exato) e desequilíbrio de ligação foram feitos no programa GENEPOP 3.3 (Raymond & Rousset 1995). Nos testes múltiplos, as probabilidades foram corrigidas pelo número de testes feitos segundo Rice (1989). A matriz de

distâncias de Nei (1978) foi analisada pelo método de ordenação denominado escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS).

Para testar evidências de gargalos populacionais recentes, usou-se a abordagem de coalescência de Cornuet & Luikart (1996), no programa BOTTLENECK. O teste de Wilcoxon (*signed-rank test*) foi usado para testar se a heterozigosidade observada excedia a esperada em um equilíbrio mutação-deriva, sob o modelo de alelos infinitos. O teste de Mantel foi feito para verificar se havia correlação entre as distâncias genéticas (F_{ST} par a par) e geográficas. Os valores de F_{ST} foram transformados em $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ e plotados contra as distâncias geográficas em uma dimensão (Rousset 1997). As distâncias geográficas (km) foram calculadas pressupondo-se que a dispersão entre as populações ocorre através de uma linha reta. As matrizes de distância genética e geográfica foram permutadas 10.000 vezes no programa GENEPOP 3.3 (Raymond & Rousset 1995).

RESULTADOS

Obteve-se boa resolução nos seguintes locos enzimáticos: AQ, DIA-1, DIA-2, HBDH, IDH, MDH, ME, EST, PGM, FUM, GDH, PEP, PGI-1 e PGI-2 (tabela 4). Três deles, PGI-2, GDH e DIA-1 foram monomórficos em todas as populações. A variabilidade genética está apresentada na tabela 5. A diversidade genética média (H_E) foi 0,116, o número médio de alelos por loco (A), 1,64 e a porcentagem média de locos polimórficos (P), 36%. O tamanho amostral apresentou uma correlação positiva e significativa com o número médio de alelos por loco (A) ($\rho=0,58$, $p=0,008$), mas não apresentou correlação com as outras medidas de variabilidade (H_E : $p=0,5$; P : $p=0,15$). Populações SR tiveram uma variabilidade significativamente menor que as SM (teste de Mann-Whitney, H_E : $p=0,037$, P : $p=0,03$).

Tabela 4 - Distribuição das frequências alélicas nos locos com variabilidade em *T. reticulata*.

Loco	Alelo	SR4-1	SR4-2	SR4-3	SR4-4	SR4-5	SR4-6	SR4-7	SR4-8	SR5-1	SR5-2
<u>FUM</u>	(N)	10	11	30	25	13	34	34	60	9	9
	2	-	0,136	0,017	-	0,038	0,015	0,015	-	0,111	-
	3	-	-	0,033	-	0,038	0,029	0,015	-	0,056	-
	4	1,000	0,864	0,917	1,000	0,923	0,956	0,941	0,983	0,833	1,000
	5	-	-	0,033	-	-	-	0,029	0,017	-	-
<u>PEP</u>	(N)	10	11	27	24	8	33	33	57	6	9
	3	-	-	0,037	-	-	0,030	-	-	-	-
	4	1,000	1,000	0,926	1,000	1,000	0,970	1,000	0,982	1,000	1,000
	5	-	-	0,037	-	-	-	-	0,018	-	-
<u>PGI-1</u>	(N)	11	12	30	25	13	34	34	55	9	8
	2	-	0,167	-	-	0,077	-	-	-	-	-
	3	0,045	0,167	-	-	-	-	-	0,045	-	0,063
	4	0,955	0,667	0,983	1,000	0,500	1,000	1,000	0,927	1,000	0,938
	5	-	-	0,017	-	0,423	-	-	0,027	-	-
<u>GDH</u>	(N)	11	12	21	21	14	29	28	56	9	9
	3	-	-	-	-	-	-	-	0,018	-	-
	4	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,964	0,982	1,000	1,000
	5	-	-	-	-	-	-	0,036	-	-	-
<u>DIA-2</u>	(N)	7	10	27	22	9	26	25	40	5	4
	3	-	-	0,111	-	-	-	-	0,025	-	-
	4	1,000	1,000	0,889	1,000	1,000	1,000	1,000	0,975	1,000	1,000
<u>IDH</u>	(N)	11	12	19	15	13	21	22	50	9	8
	2	-	-	-	-	-	-	-	0,010	-	-
	3	0,136	0,042	0,184	-	0,192	0,167	0,068	0,180	0,278	0,063
	4	0,182	0,333	0,658	0,800	0,308	0,738	0,795	0,680	0,722	0,938
	5	0,682	0,625	0,158	0,200	0,500	0,095	0,136	0,130	-	-
<u>HBDH</u>	(N)	11	12	30	25	14	28	28	52	8	6
	3	0,045	-	0,017	0,040	0,071	-	-	-	-	-
	4	0,909	1,000	0,983	0,960	0,929	0,946	0,964	0,990	1,000	1,000
	5	0,045	-	-	-	-	0,054	0,036	0,010	-	-
<u>ME</u>	(N)	11	12	28	23	14	25	28	58	9	9
	3	-	-	-	-	0,036	-	-	-	-	0,167
	4	1,000	0,833	0,964	1,000	0,964	1,000	1,000	1,000	1,000	0,833
	5	-	0,167	0,036	-	-	-	-	-	-	-
<u>MDH</u>	(N)	11	12	22	19	13	18	17	47	6	8
	3	-	-	0,364	0,105	-	-	0,029	0,064	-	-
	4	0,864	0,625	0,591	0,895	0,808	1,000	0,912	0,840	0,917	0,813
	5	0,091	0,333	-	-	0,192	-	-	0,043	0,083	0,188
	6	0,045	0,042	0,045	-	-	-	0,059	0,053	-	-
<u>PGM</u>	(N)	11	12	23	15	13	19	21	57	9	8
	2	-	0,042	-	-	-	0,026	-	-	-	0,063
	3	0,045	0,250	-	-	-	-	-	0,009	-	-
	4	0,909	0,708	1,000	1,000	0,962	0,974	1,000	0,991	1,000	0,938
	5	0,045	-	-	-	0,038	-	-	-	-	-
<u>AO</u>	(N)	11	11	24	21	12	26	25	49	4	5
	2	-	-	-	-	-	0,019	-	-	-	-
	3	0,045	-	0,042	0,048	0,083	0,077	-	0,020	-	-
	4	0,955	0,909	0,833	0,952	0,917	0,904	0,960	0,980	1,000	1,000
	5	-	0,091	0,125	-	-	-	0,040	-	-	-

Continuação da tabela 4.

Loco	Alelo	LA04	CA04	LA5-1	LA5-2	LA5-3	LA5-4	LA5-5	CA05	LU05
<u>FUM</u>	(N)	31	11	10	9	9	14	8	10	11
	2	-	-	-	-	-	0,071	-	-	-
	3	0,177	0,091	-	0,111	-	0,143	-	-	-
	4	0,758	0,909	1,000	0,889	1,000	0,714	0,875	1,000	0,909
	5	0,065	-	-	-	-	0,071	0,125	-	0,091
<u>PGI-1</u>	(N)	31	11	10	8	9	14	8	10	12
	3	0,403	0,318	0,150	0,313	0,333	0,107	0,250	0,150	0,083
	4	0,565	0,591	0,850	0,688	0,667	0,893	0,750	0,850	0,917
	5	0,032	0,045	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	0,045	-	-	-	-	-	-	-
<u>GDH</u>	(N)	23	9	8	9	7	12	8	9	12
	4	1,000	1,000	1,000	0,889	1,000	1,000	1,000	0,889	0,917
	5	-	-	-	0,111	-	-	-	0,111	0,083
<u>DIA-2</u>	(N)	27	7	6	4	5	8	7	6	7
	3	0,074	-	-	-	-	0,125	-	-	0,143
	4	0,926	1,000	1,000	1,000	1,000	0,875	1,000	1,000	0,857
<u>IDH</u>	(N)	21	11	10	9	9	13	8	10	12
	3	0,024	-	-	0,056	0,056	0,115	0,125	-	-
	4	0,857	0,636	1,000	0,944	0,833	0,808	0,875	1,000	1,000
	5	0,119	0,364	-	-	0,111	0,077	-	-	-
<u>ME</u>	(N)	31	11	10	9	9	12	8	10	12
	3	0,016	-	0,050	-	-	-	0,250	-	-
	4	0,468	0,136	0,450	0,889	0,667	0,417	0,625	0,500	0,292
	5	0,516	0,864	0,500	0,111	0,333	0,500	0,125	0,400	0,708
	6	-	-	-	-	-	0,083	-	0,100	-
<u>MDH</u>	(N)	25	9	10	9	8	13	8	10	11
	3	0,080	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,740	0,778	0,850	0,889	0,750	0,615	1,000	0,800	0,864
	5	0,160	0,222	0,150	0,111	0,250	0,385	-	0,200	0,136
	6	0,020	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>PGM</u>	(N)	27	11	10	8	9	11	8	10	8
	1	0,019	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,056	0,182	-	-	-	-	-	0,050	-
	3	0,204	0,318	0,350	0,063	0,611	0,182	0,063	0,200	-
	4	0,648	0,409	0,650	0,938	0,389	0,818	0,875	0,750	1,000
	5	0,074	0,091	-	-	-	-	-	-	-
<u>AO</u>	6	-	-	-	-	-	-	0,063	-	-
	(N)	22	10	8	4	9	14	8	10	5
	3	0,091	0,100	0,250	-	-	0,071	-	0,100	-
	4	0,818	0,900	0,750	1,000	1,000	0,929	1,000	0,900	1,000
	5	0,091	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 5: Estimativas de variabilidade genética (**A**: número médio de alelos por loco; **P**:% de locos polimórficos; **H_O**: heterozigosidade observada; **H_E**: heterozigosidade esperada; desvios-padrão entre parênteses) e endocruzamento (*f*, NS: valores não significativos) nas populações de *T. reticulata*.

População	A	P	H _E	H _O	<i>f</i>
LA04-1	2,36	57	0,222 (0,312)	0,078 (0,119)	0,66
CA04	1,78	50	0,187 (0,330)	0,081 (0,155)	0,60
LA05-1	1,40	33	0,126 (0,196)	0,053 (0,106)	0,61
LA05-2	1,47	47	0,096 (0,127)	0,056 (0,111)	0,47 (NS)
LA05-3	1,40	33	0,135 (0,202)	0,061 (0,128)	0,59
LA05-4	1,80	53	0,178 (0,204)	0,094 (0,150)	0,50
LA05-5	1,47	33	0,105 (0,170)	0,033 (0,088)	0,71
CA05	1,53	40	0,128 (0,186)	0,027 (0,059)	0,81
LU05	1,40	40	0,091 (0,130)	0,023 (0,050)	0,77
SR04-1	1,71	28	0,088 (0,291)	0,078 (0,114)	0,17 (NS)
SR04-2	1,78	50	0,186 (0,315)	0,108 (0,180)	0,46
SR04-3	2,07	43	0,139 (0,302)	0,042 (0,074)	0,71
SR04-4	1,28	14	0,048 (0,282)	0,012 (0,032)	0,75
SR04-5	1,78	43	0,148 (0,317)	0,094 (0,151)	0,40
SR04-6	1,64	21	0,064 (0,285)	0,021 (0,040)	0,68
SR04-7	1,71	21	0,060 (0,279)	0,029 (0,058)	0,52
SR04-8	2,07	20	0,081 (0,138)	0,032 (0,071)	0,61
SR05-1	1,27	20	0,056 (0,126)	0,033 (0,072)	0,46 (NS)
SR05-2	1,33	33	0,062 (0,105)	0,057 (0,104)	0,14 (NS)
Média	1,64	36	0,116	0,0533	0,56

Houve evidências significativas de gargalo genético nas populações SR01, SR03, SR06, SR07 e SR08. Não foi observado desequilíbrio de ligação entre pares de locos. Desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram detectados nos locos FUM (LA04-1, LA05-4 e SR04-7), PGI-1 (LA04-1 e SR04-5), DIA-2 (LA04-1 e SR04-3), IDH (LA04-1, CA04, SR04-3, SR04-4, SR04-5, SR04-6, SR04-7 e SR04-8), ME (LA04-1, LA05-1, LA05-5 e CA05), PGM (LA04-1), MDH (SR04-3, SR04-4 e SR04-8), AO (LA04-1, SR04-3 e SR04-6), EST (SR04-8), e PEP (SR04-3). Todos os desvios observados tiveram valores de *f* positivos.

O valor médio de θ foi 0,163 (0,078-0,243), em sua maior parte devido a diferenciação entre populações SR ($\theta=0,101$; 0,038-0,131). A estruturação entre populações SM foi bem mais baixa ($\theta=0,05$; 0,019-0,074). O teste de Mantel indicou uma correlação significativa entre distância genética e geográfica ($r=0,53$, $p=0,0014$). Não houve correlação dentro de cada região.

Os valores de θ par a par variaram bastante entre as populações; populações numa mesma região e populações em regiões diferentes tiveram valores próximos (tabela 6). A distância genética média entre populações foi 0,026. O NMDS apresenta a representação gráfica bidimensional destas distâncias (figura 2). O eixo 2 separa as populações SM (acima da linha pontilhada) das populações SR (abaixo da linha pontilhada).

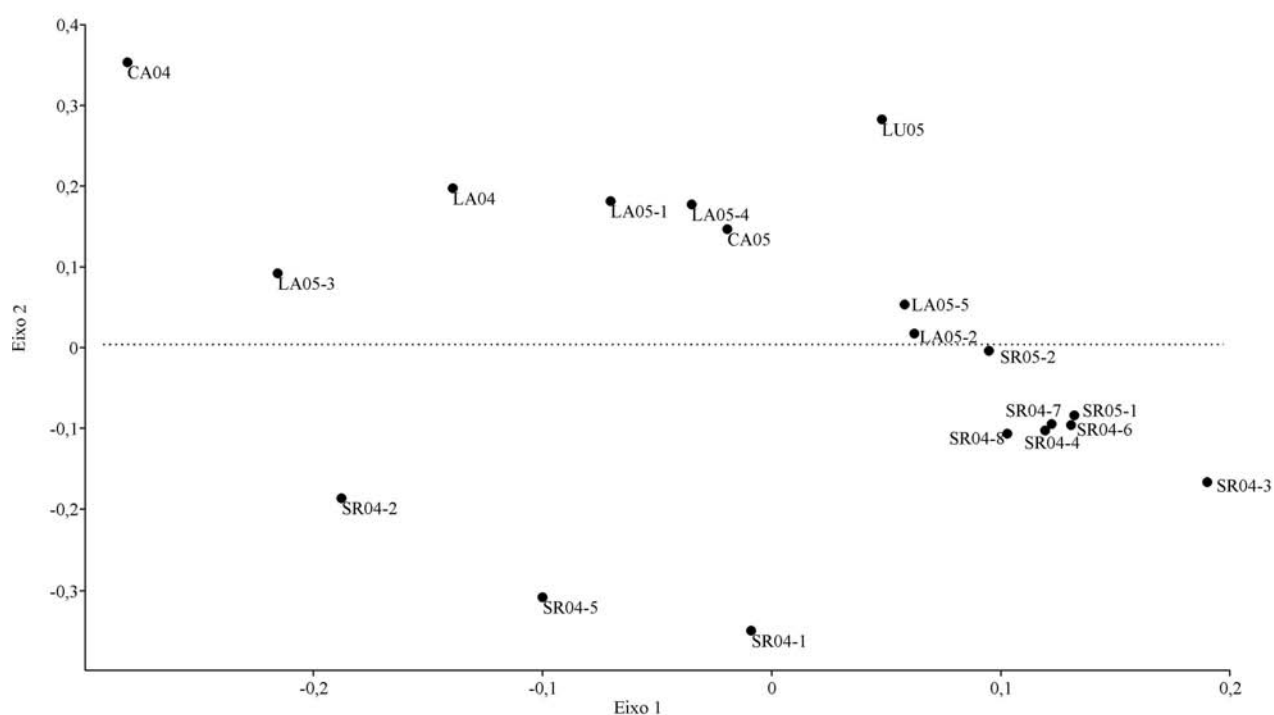


Figura 2: Distribuição das populações de *T. reticulata* no espaço bidimensional obtido por NMDS (valor de stress=0,094), usando a distância de Nei (1978).

Tabela 6: Valores de θ par a par entre todas as populações de *T. reticulata*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1.LA4-1																		
2.CA4-1	0,025																	
3.SR4-1	0,226	0,343																
4.SR4-2	0,105	0,153	0,052															
5.SR4-3	0,169	0,322	0,143	0,143														
6.SR4-4	0,206	0,432	0,235	0,228	0,057													
7.SR4-5	0,181	0,287	0,074	0,052	0,147	0,229												
8.SR4-6	0,211	0,426	0,218	0,239	0,081	0,003	0,218											
9.SR4-7	0,211	0,440	0,235	0,237	0,066	-0,022	0,235	-0,008										
10.SR4-8	0,223	0,423	0,161	0,202	0,048	0,005	0,170	0,005	-0,001									
11.SR5-1	0,142	0,349	0,227	0,164	0,016	0,040	0,166	-0,032	-0,004	-0,023								
12.SR5-2	0,099	0,296	0,288	0,167	0,051	0,049	0,197	0,041	0,032	0,017	0,037							
13.LA5-1	0,005	0,072	0,344	0,176	0,202	0,286	0,274	0,260	0,280	0,262	0,209	0,128						
14.LA5-2	0,038	0,233	0,271	0,138	0,086	0,115	0,168	0,091	0,085	0,062	0,062	0,014	0,087					
15.LA5-3	0,020	0,076	0,308	0,100	0,225	0,329	0,241	0,313	0,321	0,278	0,252	0,184	0,025	0,108				
16.LA5-4	0,012	0,073	0,245	0,109	0,151	0,242	0,203	0,233	0,234	0,224	0,128	0,088	0,015	0,075	0,063			
17.LA5-5	0,037	0,193	0,264	0,149	0,119	0,150	0,179	0,113	0,126	0,100	0,075	0,005	0,060	-0,026	0,101	0,063		
18.CA5-1	0,005	0,092	0,298	0,146	0,151	0,204	0,233	0,194	0,194	0,187	0,137	0,044	-0,059	0,013	0,023	-0,013	0,005	
19.LU5-1	0,054	0,133	0,404	0,260	0,235	0,366	0,331	0,330	0,336	0,305	0,285	0,203	0,040	0,163	0,202	0,012	0,116	-0,002

DISCUSSÃO

Diversidade genética

Vários estudos em invertebrados verificaram a influência da distribuição fragmentada do hospedeiro nos níveis de variabilidade e estruturação genética dos fitófagos (*e.g.*, Britten & Rust 1996, Keyghobadi *et al.* 1999, Britten *et al.* 2003). Aparentemente, esta relação também é observada em Tephritidae. *Tomoplagia reticulata* apresentou baixa variabilidade ($H_E=0,116$) em comparação com outros tefritídeos oligófagos ou polífagos, como *Tephritis bardanae* ($H_E=0,181$; Eber *et al.* 1991), *Rhagoletis zephyria* ($H_E= 0,245$; Feder *et al.* 1999), *Ceratitis capitata* ($H_E=0,144$; Gasperi *et al.* 1991) e *Rhagoletis alternata* ($H_E=0,190$; Vaupel *et al.* 2007). Seus níveis de variabilidade estão mais próximos ao de espécies monófagas como *Bactrocera oleae* ($H_E=0,107$; Ochando & Reyes 2000), que é especialista em *Olea europaea*. É interessante observar que se usássemos a mesma definição de monófago que Peterson & Denno (1998b), fitófagos que se alimentam em um gênero de planta, *Rhagoletis zephyria* e *Tephritis bardanae* seriam consideradas especialistas e a relação entre nível de especialização e variabilidade não seria observada. *Rhagoletis zephyria* parasita plantas do gênero *Symphoricarpos* e *Tephritis bardanae* parasita o gênero *Arctium*.

Na comparação entre regiões, SR apresentou menor variabilidade que SM. Houve evidências significativas de gargalo apenas em populações de SR. Estes gargalos diminuiriam as populações desta região, tornando-as mais susceptíveis aos efeitos da deriva, o que explicaria a menor variabilidade observada nesta região.

Houve uma significativa deficiência de heterozigotos em todas as populações, indicada pelos desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Estes desvios podem ser explicados pela ocorrência de endocruzamento nas populações, como indicado pelos valores de f altos e positivos. Outras explicações para os desvios ao equilíbrio de Hardy-Weinberg seriam a presença de alelos nulos e o efeito Wahlund. Se alelos nulos estivessem presentes, alguns locos apresentariam desvios consistentes, independente da população, o que

não foi observado. A deficiência de heterozigotos poderia, então, ser resultado da mistura de várias populações com diferentes frequências alélicas (efeito Wahlund). Como nossa unidade amostral engloba moscas de uma única árvore, é bastante improvável termos amostrado mais de uma população ao mesmo tempo. Entretanto, há exemplos de demes diferentes em uma única árvore como no homóptero *Nuculaspis californica* que parasita pinheiros (*Pinus ponderosa*). Este inseto, extremamente sedentário, apresenta populações geneticamente diferenciadas a distâncias extremamente curtas, até mesmo entre ramos de uma árvore (Alstad & Corbin 1990).

Estruturação genética

A estrutura genética de insetos fitófagos é influenciada pela distribuição e disponibilidade do hospedeiro. A distribuição fragmentada de *E. glomerulatus* restringe o fluxo gênico entre as populações *T. reticulata*, criando uma grande estruturação entre elas ($\theta=0,163$). A influência da distribuição do hospedeiro na diferenciação das populações de fitófagos já foi observada em vários estudos com isozimas. *Urophora cardui*, um tefritídeo galhador que parasita exclusivamente *Cirsium arvense* apresenta um alto valor de F_{ST} (0,13; Eber & Brandl 1997). Já *Rhagoletis alternata*, que possui várias espécies de Rosaceae como hospedeiro, apresenta uma estruturação bem menor (0,018; Vaupel *et al.* 2007) pois a distribuição de todas as plantas formaria um contínuo de hospedeiros. Este padrão fica ainda mais claro quando observamos os valores de estruturação em *Bactrocera oleae* (Ochando & Reyes 2000). Este fitófago é especialista em *Olea europaea*, mas apresenta baixa estruturação (0,027). Esta menor diferenciação entre as populações de *B. oleae* pode ser explicada pela grande disponibilidade da planta hospedeira na Espanha, local onde o estudo foi realizado.

Estimadores de estruturação indicaram que a diferenciação é consideravelmente maior entre regiões que entre populações dentro de uma região, sugerindo restrições ao fluxo gênico com o aumento da distância geográfica. Esta restrição foi confirmada pela correlação positiva e significativa entre distância genética e geográfica entre populações localizadas em regiões

diferentes, geograficamente distantes. Dentro de uma região, todavia, não se detectou isolamento por distância (IBD). Para que o F_{ST} esteja correlacionado com o fluxo gênico deve haver um equilíbrio entre os efeitos da deriva genética e o fluxo gênico (Wright 1946, Kimura & Weiss 1964). Entretanto, populações naturais geralmente não se encontram neste equilíbrio devido a vários fatores como gargalos ou expansões populacionais recentes (Lavery *et al.* 1996, Comes & Abbott 1998, Turgeon & Bernatchez 2001). Já o IBD a longas distâncias pode ser devido a processos que não pressupõem equilíbrio entre deriva e migração, como demonstrado por Rousset (2001).

A grande diferenciação local e a ausência de isolamento por distância dentro de uma região sugerem que o fluxo gênico entre as populações é bastante limitado, como já observado para artrópodes sedentários por Peterson & Denno (1998b). Não há estudos sobre o comportamento de dispersão de *T. reticulata* mas estudos em outros tefritídeos sugerem que eles não dispersam grandes distâncias. Em *Eurosta solidaginis* o movimento das fêmeas dentro de um fragmento é relativamente curto; as moscas se deslocaram em torno de 6,4m em um período de 2,5-3,0h (Cronin *et al.* 2001). Para *Anastrepha fraterculus*, Kovalesski *et al.* (1999) encontrou que 94,7% das moscas marcadas permaneceram dentro de 200m do ponto de liberação. Dados de marcação e recaptura de *Bactrocera latifrons* sugerem que esta espécie tem pouco movimento na presença do hospedeiro. Quando o hospedeiro não está presente, pelo menos algumas moscas voam mais longe do que o esperado (dispersores de longa distância). Desta forma, o fluxo gênico em *B. latifrons* é restrito na escala local, mas alguns eventos de migração a longa distância ocorrem esporadicamente (Peck & McQuate 2004). Estes eventos podem ser facilitados pelo carregamento pelo vento, como sugerido por Goldenberg *et al.* (1975) para *Ceratitis capitata*.

Em nosso estudo, a tendência de maior diferenciação e menor diversidade genética em fitófagos especialistas foi confirmada. A discordância entre nossos resultados e os de Peterson & Denno (1998a) provavelmente relaciona-se à definição de especialista utilizada, como já

observado em outros trabalhos (Kelley *et al.* 2000). A disponibilidade restrita de habitats adequados causaria as baixas taxas de migração entre populações. Além disso, como o fragmento no qual as populações são encontradas é estável, pode ser vantajoso para os indivíduos neles permanecerem, já que eles podem atingir facilmente plantas hospedeiras próximas (Ronce & Olivieri 1997, Travis & Dytham 1999).

Capítulo 3 – Evidências genéticas de uma zona de contato entre duas espécies crípticas de *Tomoplagia*

INTRODUÇÃO

O clima é um fator determinante da distribuição geográfica de muitas espécies (Andrewartha & Birch 1954). O recente aquecimento do globo durante as últimas décadas, seguido pelo aumento da temperatura, causou rápidas mudanças nos limites de distribuição de espécies de vários grupos como borboletas, invertebrados marinhos e aves (*e.g.* Southward *et al.* 1995, Thomas & Lennon 1999, Parmesan & Yohe 2003, Root *et al.* 2003, Böhning-Gaese & Lemoine 2004). No hemisfério norte, várias espécies estão se movendo para o norte devido aos invernos mais quentes. O limite norte da borboleta *Atalopedes campestris*, por exemplo, expandiu da Califórnia para o estado de Washington (670 Km) em apenas 35 anos (Crozier 2003, 2004).

No hemisfério sul, a resposta ao aquecimento global ocorre em direção contrária; as espécies migram para regiões mais temperadas, ao sul de sua distribuição original. No Brasil, foi registrada uma grande expansão da área de distribuição de um tefritídeo (Diptera), *Tomoplagia pallens*, em direção a uma região mais fria. *T. pallens* é normalmente encontrada em Goiás mas, em 2000, chegou a Minas Gerais, região ocupada por uma espécie irmã, *T. reticulata*. Neste evento de simpatria, no município de Santana do Riacho, houve hibridação entre as espécies (Abreu & Solferini 2008). Nas coletas realizadas em MG nos anos subseqüentes, somente indivíduos de *T. reticulata* foram obtidos e houve um decréscimo na frequência dos genótipos de *T. pallens* nas populações de *T. reticulata* com o passar dos anos. O caráter episódico da migração de *T. pallens* a MG levantou a possibilidade de sua associação com algum fenômeno ocasional de temperatura ao invés do aquecimento global.

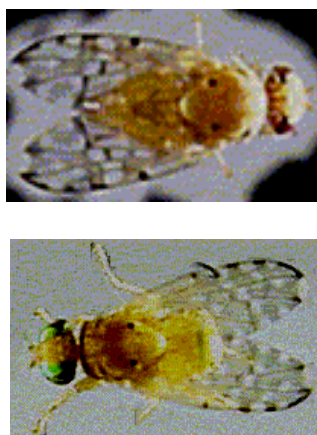


Figura 1: Foto de um indivíduo adulto de *Tomoplaga reticulata*, acima, e de *Tomoplaga reticulata*, abaixo.

Alguns fenômenos naturais, como o El Niño, podem causar o aumento da temperatura em uma região. Esses eventos podem provocar mudanças bruscas na distribuição de uma espécie mas, dado seu caráter eventual, a distribuição muitas vezes retorna a sua extensão original nos intervalos de ocorrência do fenômeno (Walther *et al.* 2002). Pouco se sabe, entretanto, sobre o tempo de recuperação da distribuição original após um El Niño. Foi observado um grande declínio nas populações de vários taxa marinhos sésseis na Bahia no evento de 1997-1998, por exemplo, e uma recuperação ocorreu somente a partir de 2001 (Attrill & Kelmo 2007). Neste El Niño, o Sudeste do Brasil apresentou um inverno mais ameno e um verão ligeiramente rigoroso, com anomalias de temperatura entre 1 e 4°C acima da média (Oliveira & Satyamurty 1998). As condições climáticas mais quentes, propiciadas por este evento de El Niño, poderiam ter permitido a migração de *T. pallens* até MG. O retorno às condições climáticas originais, alguns anos após o El Niño, teria restabelecido a distribuição original das espécies.

Para testar a hipótese de migração associada a um evento natural, resolvemos amostrar novamente em Minas Gerais logo após outro evento de El Niño (2002-2003). *Tomoplaga reticulata* e *T. pallens* ovipõem nas inflorescências de *Eremanthus glomerulatus* (Asteraceae), onde suas larvas se desenvolvem. Esta estreita relação com o hospedeiro restringe a distribuição

destes tefritídeos a regiões de ocorrência de *E. glomerulatus*. Desta forma, o caminho migratório de *T. pallens* até MG seguiria a distribuição da planta hospedeira. De acordo com a distribuição mapeada de *E. glomerulatus* (MacLeish 1987), este caminho seria pelo sul do Estado de MG (figura 1).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a composição genética das populações de *Tomoplagia reticulata* e *T. pallens* ao longo da distribuição da planta hospedeira e testar a hipótese de que a migração de *T. pallens* para Minas Gerais está associada a eventos de El Niño. Os dados obtidos neste trabalho foram comparados com os obtidos em um trabalho anterior, onde a hibridação foi descrita (Abreu & Solferini 2008).

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos indivíduos

Foram analisadas 16 populações de *T. pallens* (tabela 1) e 45 populações de *T. reticulata* (tabela 2). Destas, 9 populações de *T. reticulata* (SR-1 a SR-9) e todas as de *T. pallens* foram coletadas entre 1999-2002 (Abreu & Solferini 2008). O restante das populações de *T. reticulata* foi coletado entre 2004 e 2005. Não foram obtidos indivíduos de *T. pallens* em MG nas coletas de 2004-2005. As populações de *T. reticulata* foram separadas de acordo com a região de Minas Gerais de onde foram coletadas: as populações amostradas nos municípios de Luminárias, São Thomé das Letras, Carrancas e Lavras formam a região do Sul de Minas (SM daqui em diante) e aquelas amostradas no município de Santana do Riacho, a SR (figura 2).



Figura 2: Localização geográfica dos municípios estudados. Localidades onde *T. pallens* foi amostrada estão indicadas por quadrados pretos, onde *T. reticulata* foi amostrada pelo quadrado vermelho e onde ambas foram amostradas pelo quadrado branco. Círculos pretos indicam a distribuição de *Eremanthus glomerulatus* segundo MacLeish (1987) e a linha verde, o suposto caminho percorrido por *T. pallens* de Goiás a Minas Gerais.

Após a coleta os capítulos foram acondicionados em potes plásticos com tampa telada. Após emergirem, os adultos foram alimentados com mel e água por 4 -5 dias e depois congelados em nitrogênio líquido. A genitália externa foi dissecada e colocada individualmente em frascos contendo solução de glicerina - etanol (1:1).

Tabela 1: Localidades de coleta e número total de indivíduos de *T. pallens* amostrados e utilizados nas análises.

Código do hospedeiro	Ano	Localidade (Estado)	Coordenadas	Isozimas	RFLP	Total
BSB-1	1999	Brasília (DF)	15°36'24"S 47°34'32"W	55	31	182
BSB-2	2001	Brasília (DF)	15°36'50"S 47°41'30"W	25	30	55
BSB-3	2002	Brasília (DF)	15°40'50"S 47°52'03"W	-	30	30
BSB-4	2002	Brasília (DF)	15°40'50"S 47°52'03"W	-	24	24
GO-1	2001	Pirenópolis (GO)	15°53'30"S 48°53'19"W	32	29	128
GO-2	2001	Anápolis (GO)	16°03'49"S 48°51'15"W	34	30	114
GO-3	2001	Anápolis (GO)	16°12'05"S 48°54'39"W	34	29	63
GO-4	2001	Anápolis (GO)	16°12'05"S 48°54'39"W	-	30	30
GO-5	2001	Anápolis (GO)	16°13'14"S 48°55'20"W	31	30	61
GO-6	2001	Anápolis (GO)	16°24'27"S 48°59'08"W	41	30	71
GO-7	2001	Anápolis (GO)	16°13'16"S 48°55'22"W	-	25	25
GO-8	2001	Anápolis (GO)	16°12'06"S 48°54'40"W	-	30	30
GO-9	2001	Anápolis (GO)	16°02'38"S 48°51'07"W	-	20	20
GO-10	2001	Pirenópolis (GO)	15°53'36"S 48°52'52"W	-	30	30
SRp-1	2000	Santana do Riacho (MG)	19°17'58"S 43°36'08"W	24	-	24
SRp-2	2000	Santana do Riacho (MG)	19°17'29"S 43°36'06"W	3	-	3

Isozimas

As corridas foram realizadas em dois sistemas-tampão: (A) eletrodo: Tris 0,34 M, ácido cítrico 78 mM, pH 8,6; gel: Tris 38 mM, ácido cítrico 2,5 mM, pH 8,6; (C) eletrodo: LiOH 10 mM, H₃BO₃ 90 mM, EDTA 3mM, pH 8,0; gel: solução eletrodo diluída 1:10. Os indivíduos inteiros foram macerados manualmente com um bastão de vidro em 30µl de solução de gel do "sistema A". Em cada homogeneizado foram colocados 3 retângulos de 10 x 4 mm de papel Whatman #1, que foram aplicados em géis de amido Sigma 8,5%. Após a eletroforese os géis foram cortados e incubados a 37°C em recipiente de plástico contendo solução de coloração (Shaw & Prasad 1970). Foram testados os seguintes sistemas enzimáticos: desidrogenase da glicose 6- fosfato (G6PD - EC 1.1.1.49, sistema A), isomerase da glicose-fosfato (PGI - EC 5.3.1.9, sistema A), enzima málica (ME - EC 1.1.1.40, sistema C) e desidrogenase do malato (MDH - EC 1.1.1.37, sistema C), que possuem locos diagnósticos para as espécies (Abreu *et al.* 2005). Após a coloração os géis foram fixados em uma mistura de metanol, água e ácido acético glacial (5:5:1). Depois de fixados, os géis foram fotografados e diafanizados em glicerina 5%.

Tabela 2: Localidades de coleta e número de indivíduos de *T. reticulata* amostrados e utilizados nas análises.

Código do hospedeiro	Ano	Localidade (MG)	Coordenadas	Isozimas	RFLP	Total
CA04-1	2004	Carrancas	21°26'49,4"S 44°39'29,4"W	11	-	11
CA04-2	2004	Carrancas	21°26'49,4"S 44°39'29,4"W	-	18	22
CA05-1	2005	Carrancas	21°26'45,4"S 44°40'36,7"W	10	-	11
CA05-2	2005	Carrancas	21°26'45,1"S 44°40'36,2"W	-	17	27
CA05-3	2005	Carrancas	21°26'45,1"S 44°40'35,6"W	-	30	65
CA05-4	2005	Carrancas	21°26'45,7"S 44°40'23,7"W	-	13	14
LA04-1	2004	Lavras	21°19'43,1"S 44°58'19,8"W	31	20	51
LA05-4	2005			14	36	50
LA04-2	2004	Lavras	21°19'42,2"S 44°58'23,6"W	-	19	19
LA04-3	2004	Lavras	21°19'42,2"S 44°58'23,6"W	-	22	23
LA04-4	2004	Lavras	21°19'40,6"S 44°58'6,3"W	-	19	24
LA05-7	2005			-	17	17
LA05-1	2005	Lavras	21°19'42,2"S 44°58'23,6"W	10	-	12
LA05-2	2005	Lavras	21°19'42,2"S 44°58'23,6"W	9	-	10
LA05-3	2005	Lavras	21°19'43,1"S 44°58'19,8"W	9	-	10
LA05-5	2005	Lavras	21°19'43,1"S 44°58'19,8"W	8	-	9
LA05-6	2005	Lavras	21°19'42,4"S 44°58'23,5"W	-	22	22
LA05-8	2005	Lavras	21°19'41,6"S 44°58'26,4"W	-	15	15
LU04	2004	Luminária	21°31'53"S 44°50'47"W	-	27	29
LU05-1	2005	Luminária	21°31'53"S 44°50'47"W	12	-	12
LU05-2	2005	Luminária	21°31'53"S 44°50'47"W	-	20	20
ST05	2005	São Thomé	21°43'14,8"S 44°59'53,8"W	-	14	14
SRr-1	2000	Santana do Riacho	19°17'58"S 43°36'08"W	24	-	24
SRr-2	2000	Santana do Riacho	19°17'29"S 43°36'06"W	47	24	71
SR-3	2001	Santana do Riacho	19°17'58"S 43°36'08"W	32	30	487
SR-4	2001	Santana do Riacho	19°17'58"S 43°36'08"W	-	20	20
SR-5	2001	Santana do Riacho	19°17'51"S 43°36'09"W	-	20	20
SR-6	2001	Santana do Riacho	19°17'29"S 43°36'06"W	-	30	30
SR-7	2002	Santana do Riacho	19°17'56"S 43°36'09"W	-	21	21
SR-8	2002	Santana do Riacho	19°17'28"S 43°36'06"W	-	17	17
SR-9	2002	Santana do Riacho	19°17'28"S 43°36'06"W	27	28	55
SR04-1	2004	Santana do Riacho	19°17'56,7"S 43°36'8,2"W	11	-	12
SR04-2	2004	Santana do Riacho	19°16'43,6"S 43°35'4,3"W	12	-	12
SR05-2	2005			9	-	9
SR04-3	2004	Santana do Riacho	19°17'28,8"S 43°36'6,4"W	30	30	76
SR04-4	2004	Santana do Riacho	19°17'28,8"S 43°36'6,4"W	25	30	60
SR04-5	2004	Santana do Riacho	19°17'28,8"S 43°36'6,4"W	14	-	14
SR04-6	2004	Santana do Riacho	19°17'28,8"S 43°36'6,4"W	34	30	90
SR04-7	2004	Santana do Riacho	19°17'28,8"S 43°36'6,4"W	34	30	88
SR04-8	2004	Santana do Riacho	19°17'27,1"S 43°36'6,3"W	63	32	156
SR05-4	2005			-	23	23
SR04-9	2004	Santana do Riacho	19°17'56,9"S 43°36'7,6"W	-	16	16
SR05-1	2005	Santana do Riacho	19°17'56,7"S 43°36'8,2"W	9	-	10
SR05-3	2005	Santana do Riacho	19°17'56,9"S 43°36'7,6"W	-	13	14
SR05-5	2005	Santana do Riacho	19°17'12,2"S 43°36'1,2"W	-	12	13

PCR-RFLP do mtDNA

O ácido nucléico total foi isolado utilizando-se o protocolo de fenol-clorofórmio descrito por Azeredo-Espin *et al.* (1991) com adaptações. A eluição final foi feita em 30 µl de 1xTE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8,0). A região contígua dos genes COI/COII, com 2325pb, foi amplificada utilizando-se os *primers* TY-J-1460 (mtD-4) e TK-N-3785 (mtD-20) (descritos em Simon *et al.* 1994), compreendendo a região entre as posições 1460 e 3785 do mtDNA de *Drosophila yakuba* (Clary & Wolstenhome 1987).

Todos os fragmentos amplificados foram digeridos com 6 enzimas que reconhecem de 4 a 6 pares de base. As enzimas e os respectivos sítios de clivagem estão indicados a seguir: *DdeI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *PvuII*, *RsaI* e *XbaI*. A digestão foi realizada utilizando-se 8µl de produto amplificado, 2,5µl do tampão de digestão de cada enzima, 1U de enzima de restrição e água milliQ até o volume final de 15µl. Posteriormente as amostras foram aplicadas em gel de agarose (2,5%) em tampão TAE 1x, submetidas a uma voltagem de 100V e mantidas até que se completasse a corrida (aproximadamente 4 horas). Os géis foram corados com brometo de etídeo, visualizados com luz UV e fotografados, para leitura posterior.

Análises utilizadas

Isozimas

As frequências gênicas foram avaliadas pela leitura direta dos géis. As estimativas de variabilidade genética (número de locos polimórficos, heterozigosidades observada e esperada, número de alelos por loco) e a distância genética entre as populações (Nei 1978) foram calculadas no programa GENETIX 4.05.2 (Belkhir *et al.* 2004). As estimativas de variabilidade foram comparadas entre regiões e entre anos de coleta através de um teste Mann-Whitney (Zar 1996). Testes para verificar desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (por teste exato) e desequilíbrio de ligação foram feitos no programa GENEPOP 3.3 (Raymond & Rousset 1995). Nos

testes múltiplos, as probabilidades foram corrigidas pelo número de testes feitos segundo Rice (1989). Foi construído um dendrograma por *neighbor-joining* usando Nei (1978) como distância no programa MEGA 3.0 (Kumar *et al.* 2004).

PCR-RFLP do mtDNA

Os géis foram analisados visualmente e o tamanho dos fragmentos foi estimado pelo programa DNAfrag (Schaffer & Sederoff 1981), utilizando-se um marcador de tamanho molecular de 100 pares de base (Invitrogen®) como referência. Posteriormente, foi construída uma matriz de presença/ausência (1/0) de sítios de restrição a partir destes perfis. Estimativas da diversidade de haplótipos (h ; Nei 1987) e de nucleotídeos (π ; Nei 1987), o número de diferenças nucleotídicas entre as populações (D), este número corrigido (descontando a variação intrapopulacional) (DA) (Nei & Li 1979) e as árvores de haplótipos (*minimum spanning networks*) foram calculados pelo programa ARLEQUIN (Excoffier *et al.* 2005). Neste mesmo programa também foi feita a análise de variância molecular hierárquica (AMOVA), com 1000 replicações e foi calculado o F_{ST} (Excoffier *et al.* 1992). A estrutura genética das populações foi investigada por uma análise da composição da variância (AMOVA). A matriz de distâncias (DA) foi analisada pelo método de ordenação denominado escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS). As estimativas de variabilidade foram comparadas entre espécies, entre regiões e entre anos de coleta através de um teste Mann-Whitney (Zar 1996).

A atribuição de cada indivíduo a uma população, com base no seu genótipo, foi feita no programa STRUCTURE (Falush *et al.* 2007). Vinte simulações independentes foram feitas para cada valor de número de agrupamento K (K de 1 a 6). Em cada simulação, foram feitas 500 000 iterações com um descarte inicial (*burn-in*) de 50 000 iterações. As análises foram inicialmente feitas *sem priori* em relação à população. As simulações foram então feitas para o K mais

provável (segundo Evanno *et al.* 2005), usando o local de coleta como informação prévia, e estimando-se a probabilidade de mistura para cada indivíduos nas quatro últimas gerações.

RESULTADOS

Isozimas

Obteve-se boa resolução nos seguintes locos enzimáticos: PGI, MDH e ME. As frequências alélicas dos locos enzimáticos estão apresentadas nas tabelas 3 e 4. Os alelos mais frequentes nas populações de *T. pallens* foram PGI³, MDH⁵ e ME⁵ e nas populações de *T. reticulata* foram PGI⁴, MDH⁴ e ME⁴. Entretanto, algumas populações de *T. reticulata* SM possuem alelos característicos de *T. pallens*, em frequência próxima ao alelo característico de sua própria espécie, muitas vezes em homozigose.

Tabela 3: Distribuição das frequências alélicas nos locos diagnósticos entre *T. pallens*. Em cinza claro, estão os alelos característicos de *T. pallens* e em cinza escuro, os de *T. reticulata*.

Loco	Alelo	BSB-1	SRp-1	BSB-2	GO-1	GO-2	GO-3	GO-5	GO-6
<u>PGI</u> -1	(N)	54	16	25	32	34	34	31	41
	2	-	-	0,040	0,065	-	-	-	0,024
	3	0,954	1,000	0,960	0,938	1,000	1,000	1,000	0,976
	4	0,046	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>ME</u>	(N)	43	14	25	32	34	34	34	42
	3	-	0,071	-	-	0,029	-	-	-
	4	0,140	0,286	-	-	-	-	0,029	-
	5	0,814	0,429	0,960	1,000	0,941	0,912	0,971	1,000
<u>MDH</u>	6	0,047	0,214	0,040	-	0,029	0,088	-	-
	(N)	45	14	24	30	34	32	34	40
	3	0,067	-	0,021	0,017	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	0,016	0,029	-
	5	0,933	1,000	0,979	0,917	1,000	0,984	0,971	0,975
	6	-	-	-	0,067	-	-	-	0,025

A variabilidade genética de *T. reticulata* está apresentada na tabela 5 e a de *T. pallens* na tabela 6. *T. reticulata* apresentou maior variabilidade que *T. pallens* ($H_E - p_{MW}=0,003$; $H_O - p_{MW}=0,004$; $P - p_{MW}=0,005$); as populações SM tiveram uma variabilidade significativamente maior que as SR ($H_E - p_{MW}=0,006$; $P - p_{MW}=0,004$). A diversidade genética média (H_E), por exemplo, foi 0,092 em *T. pallens* e 0,261 em *T. reticulata*, sendo 0,364 em SM e 0,196 em SR. O valor de θ , estimador de F_{ST} , foi 0,09 (0,002-0,15) em *T. pallens* e 0,36 (0,19-0,41) em *T. reticulata*.

Tabela 5: Estimativas de variabilidade genética dos locos enzimáticos (**A**: número médio de alelos por loco; **P**:% de locos polimórficos; **H_O**: heterozigosidade observada; **H_E**: heterozigosidade esperada; desvios-padrão entre parênteses) nas populações de *T. reticulata*.

População	A	P	H _E	H _O
LA04-1	3,33	100	0,484 (0,055)	0,206 (0,165)
CA04	2,67	100	0,376 (0,157)	0,226 (0,136)
LA05-1	2,33	100	0,352 (0,167)	0,167 (0,115)
LA05-2	2,00	100	0,275 (0,134)	0,199 (0,187)
LA05-3	2,00	100	0,421 (0,040)	0,083 (0,144)
LA05-4	2,33	100	0,411 (0,196)	0,233 (0,203)
LA05-5	2,00	66,7	0,302 (0,273)	0
CA05	2,33	100	0,385 (0,172)	0,100 (0,100)
LU05	2,00	100	0,267 (0,133)	0,114 (0,046)
SRr-1	1,67	66,7	0,288 (0,256)	0,167 (0,289)
SRr-2	2,33	100	0,339 (0,222)	0,038 (0,066)
SR-3	2,00	66,7	0,325 (0,256)	0,021 (0,018)
SR-9	1,67	33,3	0,190 (0,270)	0,025 (0,043)
SR04-1	2,00	33,3	0,110 (0,124)	0,091 (0,091)
SR04-2	2,67	100	0,425 (0,127)	0,222 (0,255)
SR04-3	2,33	33,3	0,206 (0,269)	0,065 (0,029)
SR04-4	1,33	33,3	0,063 (0,109)	0
SR04-5	2,33	66,7	0,315 (0,248)	0,178 (0,179)
SR04-6	1,00	0	0	0
SR04-7	1,67	33,3	0,055 (0,095)	0,059 (0,102)
SR04-8	2,67	66,7	0,141 (0,142)	0,060 (0,054)
SR05-1	1,33	33,3	0,051 (0,088)	0,056 (0,096)
SR05-2	2,00	100	0,233 (0,101)	0,204 (0,148)
Média	2,09	71,0	0,261	0,109

Tabela 6: Estimativas de variabilidade genética dos locos enzimáticos (**A**: número médio de alelos por loco; **P**:% de locos polimórficos; **H_o**: heterozigosidade observada; **H_e**: heterozigosidade esperada; desvios-padrão entre parênteses) nas populações de *T. pallens*.

População	A	P	H _e	H _o
BSB-1	2,33	66,7	0,176 (0,122)	0,031 (0,053)
BSB-2	2,00	0	0,065 (0,021)	0,014 (0,024)
GO-1	2,00	66,7	0,092 (0,081)	0,011 (0,019)
GO-2	1,67	33,3	0,037 (0,065)	0,020 (0,034)
GO-3	1,67	33,3	0,064 (0,085)	0,010 (0,018)
GO-5	1,67	0	0,038 (0,033)	0
GO-6	1,67	0	0,032 (0,028)	0
SRp-1	2,00	33,3	0,228 (0,395)	0
SRp-2	1,33	33,3	0,093 (0,160)	0,111 (0,192)
Média	1,81	29,62	0,092	0,022

Não foi observado desequilíbrio de ligação entre pares de locos. Desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram detectados nos três locos: PGI-1 (LA04-1 e SR04-5 em *T. reticulata* e GO-01 em *T. pallens*), ME (LA04-1, LA05-1, LA05-5, CA05, SRr1 e SRr2 em *T. reticulata* e BSB1, Srp1 e GO-03 em *T. pallens*), MDH (SR04-3, SR04-8, SR3 em *T. reticulata* e BSB1 em *T. pallens*). Todos os desvios observados tiveram valores de *f* positivos.

No dendrograma, as populações se agruparam por espécie (figura 3). Dentro do ramo de *T. reticulata*, as populações se agruparam por região. As populações SM ocupam uma posição intermediária entre as populações SR e as populações de *T. pallens*; algumas populações SM são mais similares à *T. pallens* do que a populações de sua própria espécie. Estas populações SM possuem alelos comuns em *T. pallens* (PGI³, MDH⁵ e ME⁵) em alta frequência.

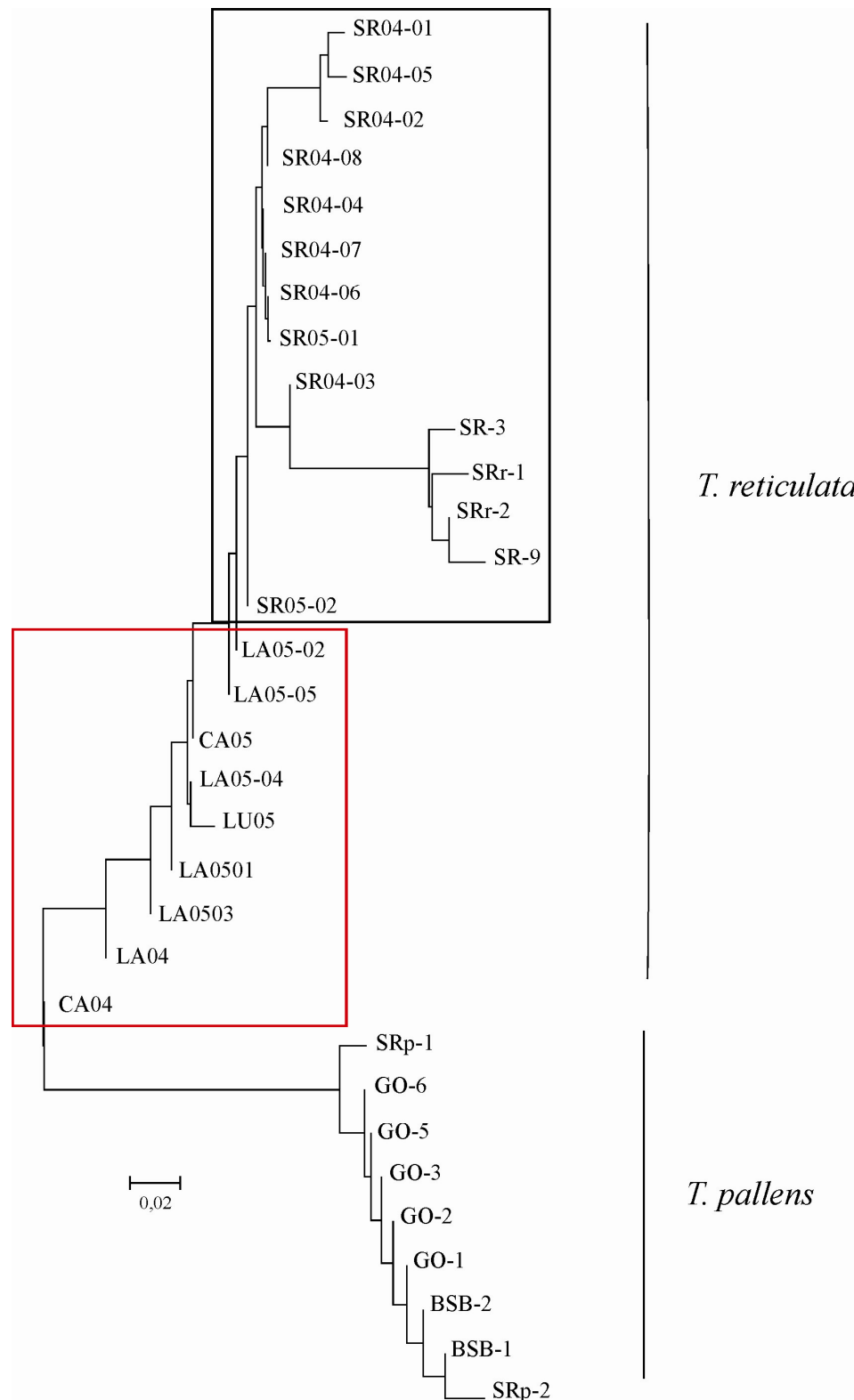


Figura 3: Dendrograma das populações de *T. reticulata* e *T. pallens* gerado pelo método de *neighbor-joining* baseado na distância genética de Nei (1978). No quadrado vermelho estão as populações de *T. reticulata* SM e no preto, as SR

PCR-RFLP do mtDNA

A frequência observada dos 35 haplótipos mitocondriais em cada espécie está representada nas tabelas 7 e 8 e a relação entre eles na figura 3. Os haplótipos A, B e J foram os mais freqüentes: A em todas as populações de *T. pallens*, J em 21 populações de *T. reticulata* (todas as populações SR e 5 SM) e B em 10 populações de *T. reticulata* (somente em populações SM). Os haplótipos A e B foram compartilhados entre as espécies. O haplótipo mais comum em *T. pallens*, A, está a apenas um passo mutacional do haplótipo mais comum nas populações SM de *T. reticulata*, B. Já a distância entre os haplótipos mais comuns em SM e SR é bem maior (figura 4).

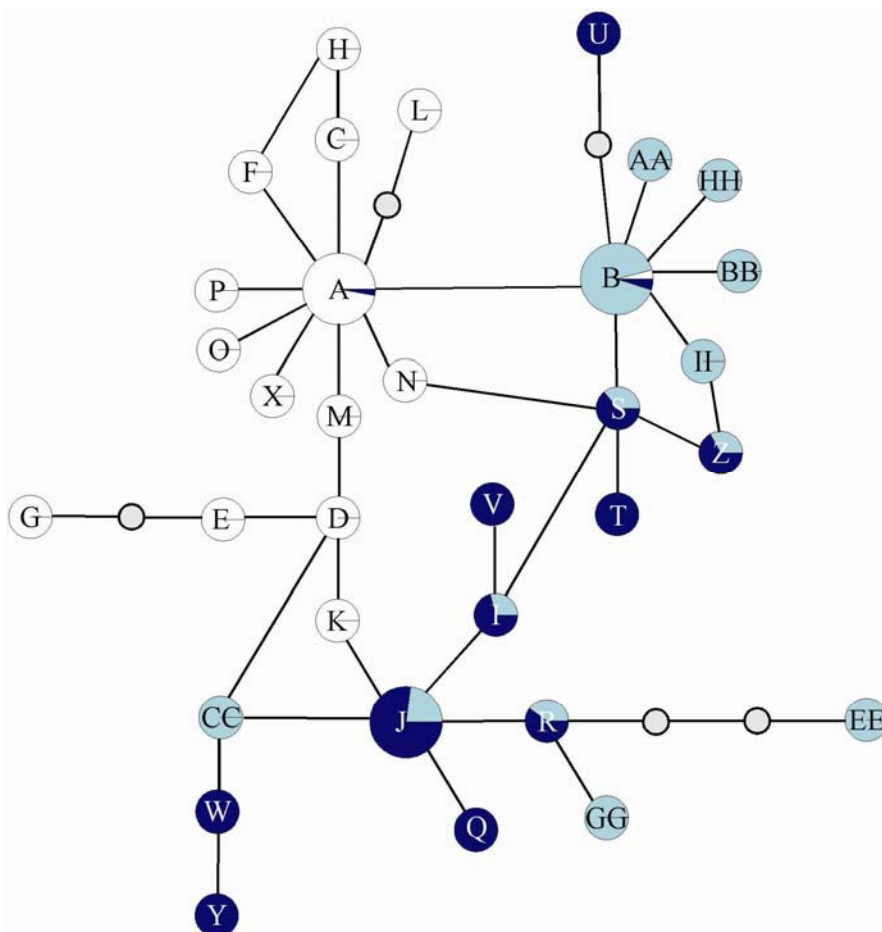


Figura 4: Rede dos haplótipos observados em *T. pallens* (branco) e *T. reticulata* (SM – azul claro e SR – azul escuro). O preenchimento dos círculos reflete a frequência em que eles foram observados, círculos maiores representam os haplótipos mais freqüentes e círculos cinza representam haplótipos ausentes.

Tabela 7: Frequências haplotípicas em *T. reticulata*.

Hap.	LA4-1	LA4-2	LA4-3	LA4-4	LA5-4	LA5-6	LA5-7	LA5-8	CA4-2	CA5-2	CA5-3	CA5-4	LU04	LU05-2	ST05	SR04-3
AA	-	-	0,045	-	-	-	-	-	-	-	0,033	-	-	-	-	-
B	0,35	0,737	0,23	0,833	0,263	0,091	1	0,6	0,778	0,588	0,133	0,769	0,815	0,85	0,786	-
BB	-	-	-	0,042	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CC	-	-	-	0,083	-	-	-	-	0,111	-	-	-	-	-	-	-
EE	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GG	-	-	0,045	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,071	-
II	-	-	-	-	-	0,045	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	-	-	0,091	-	0,105	0,409	-	-	0,056	0,059	0,2	-	-	-	0,071	0,067
J	0,40	0,158	0,545	0,042	0,632	0,455	-	0,4	0,056	0,353	0,633	0,231	0,148	0,15	0,071	0,867
R	-	0,053	0,045	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,033
S	0,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,037	-	-	-
Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,033
Z	-	0,053	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	20	19	22	24	19	22	17	15	18	17	30	13	27	20	14	30

Continuação da tabela 7.

Hap.	SR04-4	SR04-6	SR04-7	SR04-8	SR04-9	SR05-3	SR05-4	SR5-5	SR-2	SR-3	SR-4	SR-5	SR-6	SR-7	SR-8	SR-9
A	-	-	-	-	-	-	-	-	0,375	-	0,05	0,095	-	-	-	-
B	-	-	-	-	0,125	0,077	-	0,167	-	-	-	-	-	0,095	-	0,071
I	0,333	0,167	0,1	0,125	0,062	0,077	0,043	0,083	0,208	0,067	-	-	0,133	0,19	0,059	0,321
J	0,633	0,833	0,9	0,844	0,75	0,692	0,957	0,75	0,417	0,567	0,85	0,095	0,7	0,714	0,941	0,607
Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,033	0,1	0,762	-	-	-	-
R	0,033	-	-	-	-	-	-	-	-	0,033	-	-	-	-	-	-
S	-	-	-	0,031	0,062	-	-	-	-	0,233	-	-	-	-	-	-
T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,033	-	-	-	-	-	-
U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,033	-	-	-	-	-	-
V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,048	-	-	-	-
W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,167	-	-	-
Z	-	-	-	-	-	0,154	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	30	30	30	32	16	13	23	12	24	30	20	21	28	30	21	17

Tabela 8: Frequências haplotípicas em *T. pallens*.

Hap.	BSB-1	BSB-2	BSB-3	BSB-4	GO-1	GO-2	GO-3	GO-4	GO-5	GO-6	GO-7	GO-8	GO-9	GO-10
A	0,613	0,733	0,9	0,875	0,862	0,967	0,9	0,967	0,967	0,967	0,8	0,967	0,55	0,967
B	0,032	-	-	0,083	-	-	-	-	-	-	0,16	-	-	0,033
C	0,032	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	0,064	-	-	-	0,034	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	0,129	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	0,032	-	0,033	-	-	0,033	0,067	-	-	-	-	-	-	-
G	0,064	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	0,032	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	-	0,067	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L	-	0,133	-	0,042	0,103	-	-	-	-	0,033	-	0,033	-	-
M	-	0,033	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,45	-
N	-	0,033	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O	-	-	-	-	-	-	0,033	0,033	-	-	-	-	-	-
P	-	-	0,033	-	-	-	-	-	0,033	-	-	-	-	-
X	-	-	0,033	-	-	-	-	-	-	-	0,04	-	-	-
Total	31	30	30	24	29	30	30	30	30	30	25	30	20	30

O nível de diversidade variou bastante entre as populações (tabelas 9 e 10). De maneira geral, as populações com maior diversidade nucleotídica tiveram também maior diversidade haplotípica. Como em isozimas, *T. reticulata* apresentou maior variabilidade que *T. pallens* ($p_{MW}=0,003$); as populações SM de *T. reticulata* foram mais diversas que as SR ($p_{MW}=3,27 \times 10^{-5}$). A estimativa do número de populações no programa STRUCTURE indicou que a estrutura genética mais provável, considerando todas as amostras, consiste em dois agrupamentos (figura 5, $\Delta K = 2$).

Tabela 9: Diversidade haplotípica e nucleotídica em *T. reticulata*. Entre parênteses, o desvio-padrão.

População	Diversidade haplotípica (<i>h</i>)	Diversidade nucleotídica (π)
LA04-1	0,710 (0,054)	0,128 (0,085)
LA04-2	0,450 (0,128)	0,088 (0,064)
LA04-3	0,667 (0,092)	0,111 (0,076)
LA04-4	0,308 (0,118)	0,040 (0,037)
CA04-2	0,399 (0,138)	0,058 (0,048)
LU04	0,325 (0,104)	0,056 (0,046)
LA05-4	0,550 (0,099)	0,087 (0,064)
LA05-6	0,645 (0,061)	0,074 (0,058)
LA05-7	0	0
LA05-8	0,514 (0,069)	0,103 (0,073)
CA05-2	0,559 (0,083)	0,101 (0,071)
CA05-3	0,559 (0,086)	0,075 (0,056)
CA05-4	0,385 (0,132)	0,077 (0,060)
LU05-2	0,268 (0,113)	0,054 (0,045)
ST05	0,396 (0,159)	0,054 (0,046)
SR-2	0,670 (0,043)	0,137 (0,087)
SR-3	0,637 (0,081)	0,102 (0,068)
SR-4	0,279 (0,123)	0,035 (0,033)
SR-5	0,419 (0,127)	0,076 (0,055)
SR-6	0,480 (0,053)	0,076 (0,057)
SR-7	0,467 (0,112)	0,080 (0,057)
SR-8	0,118 (0,101)	0,020 (0,024)
SR-9	0,542 (0,070)	0,093 (0,063)
SR04-3	0,251 (0,102)	0,026 (0,028)
SR04-4	0,503 (0,064)	0,035 (0,336)
SR04-6	0,287 (0,092)	0,019 (0,023)
SR04-7	0,186 (0,088)	0,012 (0,018)
SR04-8	0,280 (0,095)	0,022 (0,025)
SR04-9	0,442 (0,145)	0,064 (0,051)
SR05-3	0,526 (0,153)	0,085 (0,064)
SR05-4	0,087 (0,078)	0,006 (0,012)
SR05-5	0,439 (0,158)	0,068 (0,055)

Tabela 10: Diversidade haplotípica e nucleotídica em *T. pallens*. Entre parênteses, o desvio-padrão.

População	Diversidade haplotípica (h)	Diversidade nucleotídica (π)
BSB-1	0,615 (0,096)	0,096 (0,065)
BSB-2	0,453 (0,104)	0,058 (0,046)
BSB-3	0,193 (0,095)	0,012 (0,018)
BSB-4	0,235 (0,109)	0,020 (0,024)
GO-1	0,254 (0,100)	0,033 (0,031)
GO-2	0,067 (0,061)	0,004 (0,009)
GO-3	0,191 (0,093)	0,012 (0,017)
GO-4	0,067 (0,061)	0,004 (0,010)
GO-5	0,067 (0,061)	0,004 (0,010)
GO-6	0,067 (0,061)	0,008 (0,014)
GO-7	0,347 (0,108)	0,022 (0,025)
GO-8	0,067 (0,061)	0,008 (0,014)
GO-9	0,521 (0,042)	0,032 (0,032)
GO-10	0,067 (0,061)	0,004 (0,010)

Na AMOVA (tabela 11), a maior parte da variação (65,57%) encontrada é devido à diferença entre grupos, ou seja, entre as espécies. As populações de *T. reticulata* ($F_{ST}=0,55$) apresentaram maior diferenciação que as de *T. pallens* ($F_{ST}=0,12$). Dentro de *T. reticulata*, as populações SM apresentaram maior diferenciação ($F_{ST}=0,28$) que as SR ($F_{ST}=0,15$), refletindo uma maior porcentagem de variação entre populações de SM (27,75%) que de SR (14,98%). Todas as estimativas foram significativas ($p < 0,0001$).

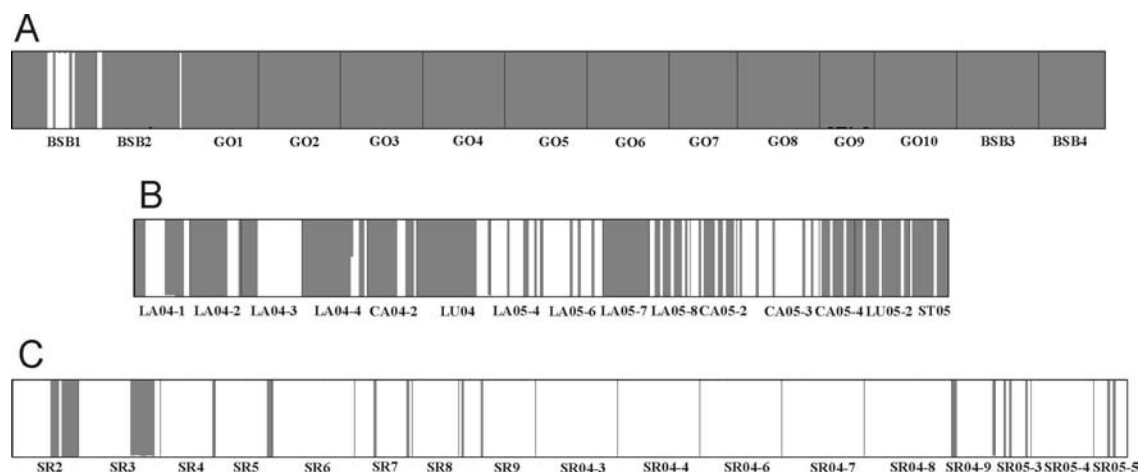


Figura 5: Estrutura genética provável dos dados mitocondriais ($K=2$) segundo STRUCTURE. **A** corresponde às populações de *T. pallens*, **B** corresponde às populações *T. reticulata* SM e **C** às populações *T. reticulata* SR.

Tabela 11: Análise de variância molecular (AMOVA) de *T. reticulata* e *T. pallens*.

Fonte de variação	Entre espécies	<i>T. reticulata</i> SM	<i>T. reticulata</i> SR	<i>T. reticulata</i>	<i>T. pallens</i>
Entre grupos	65,57%	-	-	42,36%	-
Entre populações	13,27%	27,75%	14,98%	13,24%	11,96%
Dentro das populações	21,16%	72,25%	85,02%	44,24%	88,04%
Graus de liberdade	1102	296	382	679	398
F _{ST}	0,79	0,28	0,15	0,55	0,12

O NMDS apresenta a representação gráfica bidimensional dos valores do número médio de diferenças nucleotídicas entre as populações (figura 6). O NMDS evidencia a posição intermediária das populações SM e SR-2 de *T. reticulata*, entre as populações de *T. pallens* e o restante das populações de *T. reticulata*. As populações SM compartilham alelos e haplótipos tanto com outras populações da sua espécie quanto com *T. pallens*. Já SR-2, foi descrita como uma população híbrida por Abreu & Solferini (2008).

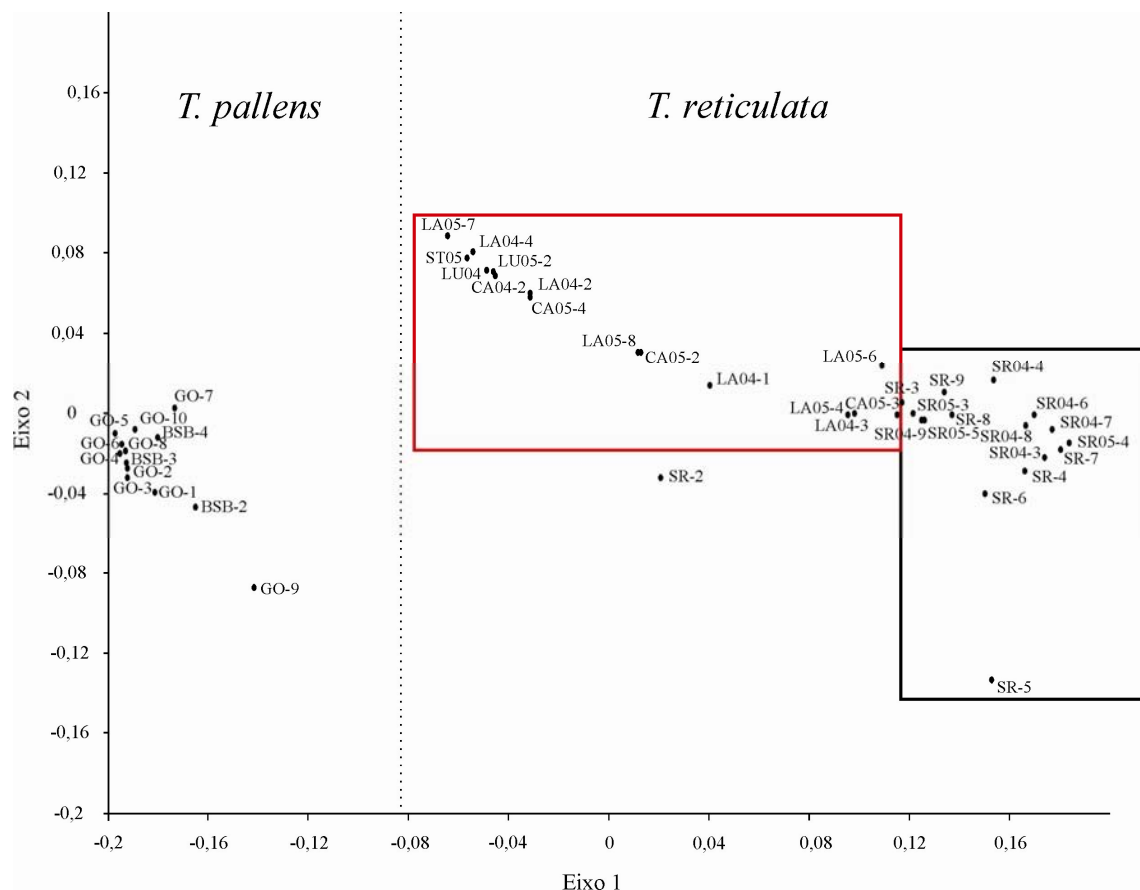


Figura 6: Distribuição das populações de *T. pallens* e *T. reticulata* no espaço bidimensional obtido por NMDS (valor de stress=0,047), usando o número de diferenças nucleotídicas entre as populações. No quadrado vermelho estão as populações de *T. reticulata* SM e no preto, as SR.

DISCUSSÃO

Os modelos climáticos prevêem um aumento médio da temperatura global de 1,4 a 5,8 °C até o fim deste século, em resposta ao aumento nas concentrações de gases ligados ao efeito estufa (Houghton *et al.* 2001). O estudo de eventos episódicos como o El Niño podem fornecer informações importantes sobre as consequências deste aumento na distribuição das espécies.

Não foi detectada a presença de *T. pallens* em MG após o El Niño de 2002-2003. Este evento teve uma intensidade bem menor que os anteriores (figura 7, CPTEC/INPE), com temperaturas menos elevadas. A simpatria, e conseqüente hibridação, entre *T. reticulata* e *T. pallens* foi observada durante o El Niño de 1997-1998, o mais forte do século (McPhaden 1999). Assim, não é possível determinar se a presença de *T. pallens* em 2000 foi conseqüência do El Niño pois as temperaturas foram bem diferentes entre os eventos 1997-1998 e 2002-2003. Além disso, dois eventos de El Niño ocorreram em seqüência (2002-2003 e 2004-2005), o que também pode restringido a migração de *T. pallens*. Já foram descritos outros casos em que extensão da zona híbrida entre duas espécies variou com a freqüência e intensidade de eventos de El Niño. Gee (2004), por exemplo, descreveu como a extensão de uma zona híbrida entre duas espécies de aves varia com o nível de precipitação, associado a eventos de El Niño.

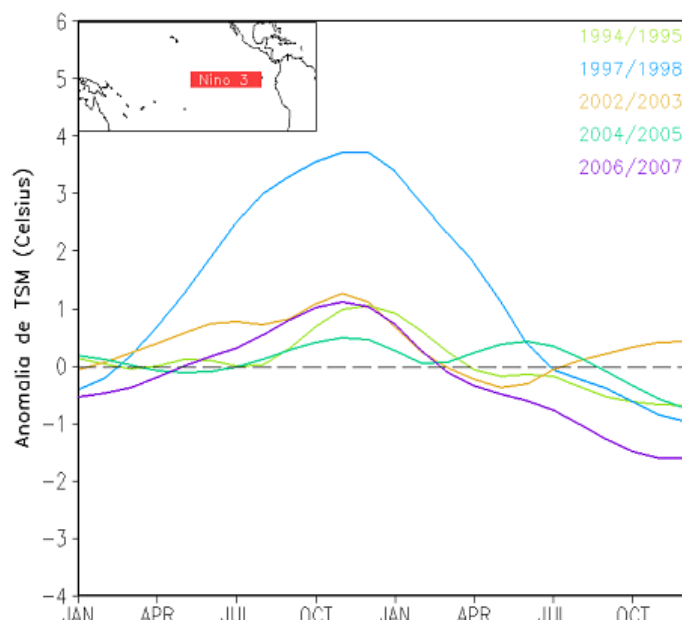


Figura 7: Evolução da temperatura de superfície do mar (TSM) dos últimos eventos de El Niño. (CPTEC/INPE, <http://img0.cptec.inpe.br/~rclima/enso/tsm/evolucao/evolnino3.gif>)

Apesar de não termos amostrado indivíduos de *T. pallens* em MG após o El Niño de 2002-2003, vários indivíduos de *T. reticulata* da região SM apresentaram alelos de isozimas característicos de *T. pallens* em seu genoma, muitas vezes em homozigose. Esta mistura de genótipos de duas espécies resultou no aumento da heterozigosidade esperada nesta região, bem superior à observada tanto em SR quanto em *T. pallens*. As populações SM também possuem elevados níveis de diversidade nucleotídica, significativamente maiores do que os observados nas outras localidades. A hibridação também influenciaria na diversidade nucleotídica; a população SR-2, híbrida segundo Abreu & Solferini (2008), apresenta o maior valor desta estimativa. O haplótipo mais comum em SM foi observado em SR e *T. pallens* em baixa frequência. Este haplótipo apresenta uma grande similaridade com os haplótipos de *T. pallens*, o que pode ser um indício de que ele provém desta espécie. Além disso, as populações SM onde a frequência do haplótipo B é alta são as mesmas que apresentam alelos de *T. pallens* nos locos enzimáticos (figura 8). Assim, ambos os marcadores sugerem uma origem híbrida de alguns indivíduos de SM. A presença de alelos/haplótipos introgrididos de *T. pallens* em SM torna estas populações diferentes de SR, o que explicaria a grande

estruturação observada nesta espécie. Outra evidência da origem híbrida das populações SM de *T. reticulata* é a posição que elas ocupam nos agrupamentos dos dois marcadores (dendrograma de isozimas, NMDS do mtDNA, agrupamentos genéticos do STRUCTURE). Nas três figuras, as populações SM ocupam uma posição intermediária entre *T. pallens* e as populações SR de *T. reticulata*.

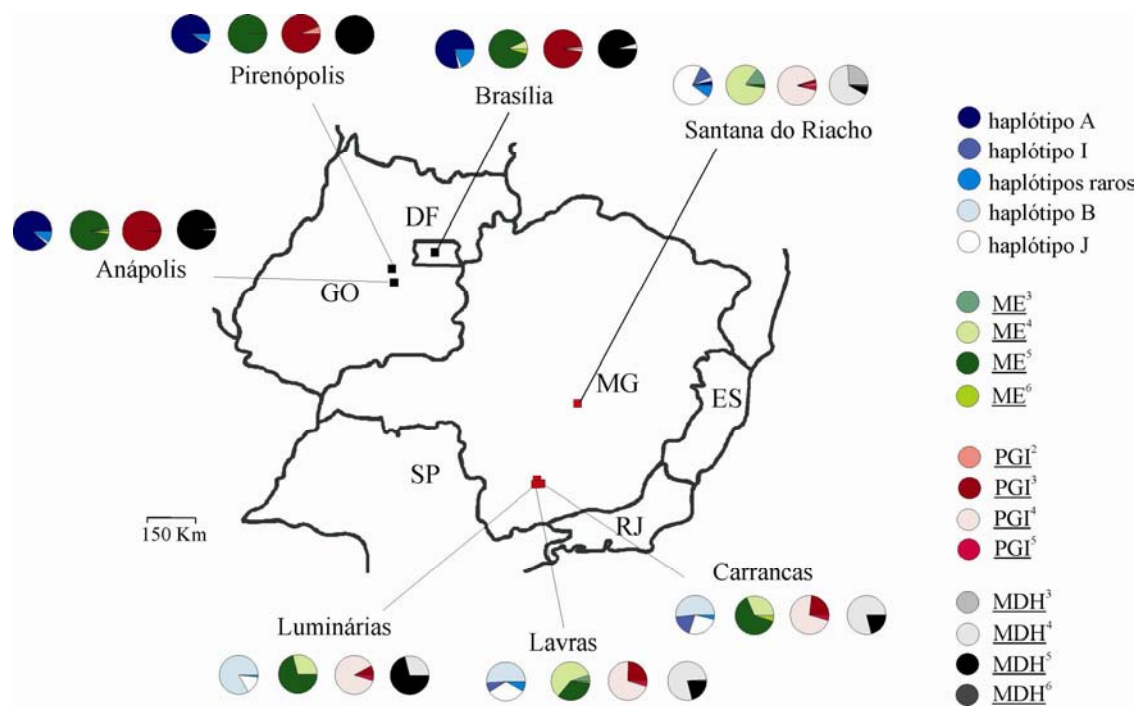


Figura 8: Composição genética mitocondrial e nuclear (locos ME, PGI e MDH) média das populações de *T. reticulata* (quadrados vermelhos) e *T. pallens* (quadrados pretos).

Aparentemente não há barreira morfológica que impeça o cruzamento entre *T. pallens* e *T. reticulata* já que houve hibridação durante a simpatria. A maior introgressão nas populações SM de *T. reticulata* indica que esta região provavelmente tem um contato mais freqüente com a espécie irmã que as populações SR. Além disso, a hibridação nesta área não parece ser um evento fortuito dado que as freqüências dos alelos introgrididos não variaram muito de um ano para outro. Como as duas regiões apresentam o mesmo tipo de clima e vegetação, alguma outra barreira impede que elas entrem em contato em SR.

A maior proximidade geográfica entre SM e Goiás facilitaria a chegada de *T. pallens* a esta região. Isso justificaria a maior ocorrência de hibridação nesta região mas não explicaria a ausência de híbridos em SR em 2002-2003, visto que *T. pallens* é capaz de chegar a SR. Para muitas espécies de inseto, a temperatura mínima é um fator crítico para a sobrevivência, principalmente para aqueles dispersando fora de sua distribuição habitual. O município de Santana do Riacho apresenta uma temperatura mínima média mais baixa e uma maior quantidade de noites mais frias que os municípios do sul de Minas (CPTEC/INPE). Esta informação foi baseada na temperatura dos meses de abril e maio pois estes seriam os meses que os parentais da geração amostrada enfrentariam. Paradis *et al.* (2008) quantificaram esta informação para um pulgão invasor (*Adelges tsugae*) nos EUA. Apenas uma noite a -40°C matou 100% dos indivíduos assim como 93 dias com temperatura mínima menor que -10°C. Assim, não somente a temperatura mínima influi na mortalidade desta espécie como também a duração do frio. Diferenças na tolerância ao frio já foram relatadas em tefritídeos. Populações de *Eurosta solidaginis* coletadas em diferentes latitudes nos EUA apresentaram diferentes taxas de sobrevivência. Larvas de locais mais frios eram mais resistentes ao frio que as de locais mais quentes (Williams & Lee 2008). Assim, dispersores chegariam eventualmente a SR mas seus descendentes não atingiriam a fase adulta.

A taxa de hibridação entre as espécies provavelmente é alta pois apesar de haver híbridos entre as espécies em SM, não foram amostrados indivíduos de *T. pallens* nesta região. Altas taxas de hibridação são comuns em casos em que a abundância das espécies é diferente, como no caso de imigrantes ocasionais com distribuição alopátrica (Chan & Levin 2005). A baixa densidade da espécie migrante comparada com a residente favoreceria cruzamentos interespecíficos devido ao pequeno número de parceiros da mesma espécie (Hubbs 1955). Em uma revisão de hibridação em animais, Wirtz (1999) encontrou evidências para esta hipótese e propôs que “cruzamentos híbridos geralmente ocorrem entre fêmeas da

espécie rara e machos da espécie comum, mas não o contrário”. Assim, a maioria dos híbridos teria uma fêmea de *T. pallens* como mãe.

Os eventos de introgressão em SR estariam associados a anos excepcionalmente quentes, como aqueles sob o efeito do El Niño intensos. Se isto se confirmar, o aquecimento global poderia contribuir para a expansão da distribuição de *T. pallens*, rumo à distribuição de *T. reticulata*, o que aumentaria o contato entre estas espécies e, conseqüentemente, o fluxo gênico e a hibridação. Como consequência, as espécies parentais podem se fundir em uma nova espécie híbrida, podem originar uma espécie híbrida enquanto permanecem intactas ou podem continuar hibridizando sem uma mudança significativa nas suas composições genéticas (Arnold 1992). O Sul de Minas Gerais parece fazer parte da rota de migração de *T. pallens* rumo à Santana do Riacho. A introgressão entre *T. pallens* e *T. reticulata* é mais comum no Sul provavelmente devido a temperaturas mínimas mais quentes no período de migração. Futuros estudos dirão se esta zona de contato é uma zona híbrida estável.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Capítulo 1 - Influência da variabilidade genética e química de *Eremanthus glomerulatus* na distribuição de *Tomoplagia reticulata*

- a) *Eremanthus glomerulatus* tem baixa variabilidade genética, provavelmente associada à distribuição restrita desta espécie.
- b) Apesar da distribuição fragmentada, há pouca estruturação entre as populações de *E. glomerulatus*. Em espécies anemocóricas, como *E. glomerulatus*, há maior fluxo gênico entre as populações em ambientes fragmentados, o que reduziria a diferenciação entre as populações.
- c) As características genéticas e químicas estudadas não explicam a variação no nível de herbivoria das populações da planta hospedeira.

Capítulo 2 - Padrões de diferenciação e diversidade genética em um fitófago especialista, *Tomoplagia reticulata*

- d) As populações de *Tomoplagia reticulata* têm baixa variabilidade genética. Especialistas apresenta populações pequenas devido a sua distribuição fragmentada, o que reduz a variabilidade genética.
- e) Há uma grande estruturação entre as populações de *Tomoplagia reticulata*. A distribuição fragmentada da planta hospedeira restringe a distribuição do inseto. Esta fragmentação do habitat reduz a coesão entre as populações, reduzindo o fluxo gênico e causando diferenciação entre as populações.
- f) A tendência de maior diferenciação e menor diversidade genética em fitófagos especialistas foi confirmada quando se usa a definição de monófago com especialistas em uma única espécie de planta hospedeira.

Capítulo 3 - Evidências genéticas de uma zona de contato entre duas espécies crípticas de *Tomoplagia*

- g) Não foram obtidos indivíduos de *T. pallens* nas coletas de 2002-2003. Entretanto, não é possível determinar se o El Niño de 1997-1998 foi o responsável pela migração de *T. pallens* até Santana do Riacho pois este evento foi muito mais forte que o de 2002-2003.
- h) Há uma zona de contato entre *T. pallens* e *T. reticulata* no Sul de Minas Gerais, onde as espécies hibridizam.
- i) O Sul de Minas Gerais parece fazer parte da rota de migração de *T. pallens* rumo à Santana do Riacho. A introgressão entre as espécies é mais comum no Sul provavelmente devido a temperaturas mínimas mais quentes no período de migração.
- j) A migração de *T. pallens* a Santana do Riacho está provavelmente associada a anos excepcionalmente quente, como os sujeitos aos efeitos do El Niño. Nestes anos, as temperaturas mínimas médias seriam melhores e permitiram a sobrevivência de *T. pallens* nesta região de MG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu AG (2003) **Caracterização genética de duas espécies crípticas de *Tomoplagia* (Diptera: Tephritidae)**, Dissertação de mestrado, Unicamp, Campinas.
- Abreu AG, Prado PI, Norrbom AL, Solferini VN (2005) Genetic and morphological diagnosis and description of two cryptic species of flower head-infesting Tephritidae (Diptera). **Insect Systematics and Evolution**, **36**, 361-370.
- Abreu AG, Solferini VN (2008) Genetic population structure and hybridization in two sibling species, *Tomoplagia reticulata* and *Tomoplagia pallens* (Diptera: Tephritidae). **Genetics and Molecular Research**, **7**, 1298-1311.
- Adams RP (1995) **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography /Mass Spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA.
- Adams RP, Demeke T, Abulfatih HA (1993) RAPD DNA fingerprints and terpenoids: clues to past migrations of *Juniperus* in Arabia and east Africa. **Theoretical and Applied Genetics**, **87**, 22-26.
- Adams RP, Schwarzbach AE, Pandey RN (2003) The concordance of terpenoid, ISSR and RAPD markers, and ITS sequence data sets among genotypes: an example from *Juniperus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, **31**, 375-387.
- Alexandrino P, Faria R, Linhares D, Castro F, Le Corre M, Sabatié R, Baglinière JL, Weiss S (2006) Interspecific differentiation and intraspecific substructure in two closely related clupeids with extensive hybridization, *Alosa alosa* and *Alosa fallax*. **Journal of Fish Biology**, **69**, 242-259.
- Alstad DN, Corbin KW (1990) Scale insect allozyme differentiation within and between host trees. **Evolutionary Ecology**, **4**, 43-56.
- Alstad DN (1998) Population structure and the conundrum of local adaptation. In: Mopper S, Strauss S (eds.) **Genetic Variation and Local Adaptation in Natural Insect Populations: Effects of Ecology, Life History, and Behavior**, Pp. 3-21. Chapman & Hall, New York.
- Andrewartha HG, Birch L C (1954) The distribution and abundance of animals. The University of Chicago Press, Chicago.
- Antunes FZ (1986) Caracterização climática do estado de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, **12**, 9-13.
- Arias MC, Infante-Malachias ME (2001) RFLP: o emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In: Matioli SR (ed.) **Biologia Molecular e Evolução**. Pp. 143-152. Editora Holos, Riberão Preto.
- Arnold ML (1992) Natural hybridization as an evolutionary process. **Annual Review of Ecology and Systematics**, **23**, 237-261.
- Ashkenas (1997) Homologous recombination in human mitochondria? **American Journal of Human Genetics**, **61**, 18.
- Attrill MJ, Kelmo F (2007) Opportunistic responses of *Diadema antillarum* (Echinodermata: Echinoidea) populations following the 1997-98 El Niño event in Bahia, Brazil. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, **73**, 243-248.
- Avice JC (2004). **Phylogeography: the history and formation of species**. 2nd edition. Harvard University Press, Cambridge.
- Avice JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel TE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, **18**, 489-522.
- Azeredo-Espin AML, Schroder RFW, Huettel MD, Sheppard WS (1991) Mitochondrial DNA variation in geographic population of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae). **Experientia**, **47**, 483-485.
- Azevedo MTA (2004) **Padrões evolutivos em um complexo de espécies de *Lychnophora* Mart. (Asteraceae) endêmico dos campos rupestres**. Dissertação de mestrado, Unicamp, Campinas.
- Azuma H, Thien LB, Kawano S (1999) Floral scents, leaf volatiles and thermogenic flowers in Magnoliaceae. **Plant Species Biology**, **14**, 121-127.
- Ballal SR, Fore SA, Guttman SI (1994) Apparent gene flow and genetic-structure of *Acer saccharum* subpopulations in forest fragments. **Canadian Journal of Botany**, **72**, 1311-1315.
- Becerra JX (1997) Insects on plants: macroevolutionary chemical trends in host use. **Science**, **276**, 253-256.

- Becerra JX, Venable DL (1999) Macroevolution of insect-plant associations: the relevance of host biogeography to host affiliation. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, **96**, 12626-12631.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996-2004) **GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations**. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Berenbaum, MR. (1990) Plant consumers and plant secondary chemistry: past, present and future. *In*: Futuyma DJ, Antonovics J (eds.) **Oxford Surveys in Evolutionary Biology** **7**. Pp. 285-307. Oxford University Press, New York.
- Bermingham E, Seutin G, Ricklefs RE (1996) Regional approaches to conservation biology: RFLP, DNA sequencing and Caribbean birds. *In*: Smith TB, Wayne RK (eds.) **Molecular genetics approaches in conservation**. Pp. 104-124. Oxford University Press, New York.
- Bernays EA, Chapman RF (1994) **Host-plant selection by phytophagous insects**. Chapman & Hall, New York.
- Bernays EA, Graham M (1988) On the evolution of host specificity in phytophagous arthropods. **Ecology**, **69**, 886-892.
- Bidwell RGS (1974) **Plant Physiology**. Macmillan, New York.
- Boecklen W, Mopper S (1998) Local adaptation in specialist herbivores: theory and evidence. *In*: Mopper S, Strauss S (eds.) **Genetic structure and local adaptation in natural insect populations: effects of ecology, life history, and behavior**. Pp. 64-90. Chapman & Hall, New York.
- Bohlmann F, Zdero C, King RM, Robinson H (1980) Sesquiterpene lactones from *Eremanthus* species. **Phytochemistry**, **19**, 2663-2668.
- Böhning-Gaese K, Lemoine N (2004) Importance of climate change for the ranges, communities and conservation of birds. *In*: Møller AP, Fiedler W, Berthold P (eds.) **Birds and Climate Change**. Pp. 211-236. Advances in Ecological Research 35, Academic Press, Londres.
- Borba EL, Semir J (1998) Wind-assisted fly pollination in three *Bulbophyllum* (Orchidaceae) species occurring in the Brazilian 'campos rupestres'. **Lindleyana**, **13**, 203-218.
- Britten HB, Rust RW (1996) Population structure of a sand dune-obligate beetle, *Eusattus muricatus*, and its implications for dune management. **Conservation Biology**, **10**, 647-652.
- Britten HB, Macclure AR, Tyler AM, Kattan AD, Olmstead KL (2003) Effects of host-plant distribution on genetic structuring of two tortoise beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) in the Northern Great Plains. **Annals of the Entomological Society of America**, **96**, 856-864.
- Buckingham J (1998) **Dictionary of natural products on CD-ROM**. Chapman & Hall, London.
- Byrd DW, McArthur ED, Wang H, Graham JH, Freeman DC (1999) Narrow hybrid zone between two subspecies of big sagebrush, *Artemisia tridentata* (Asteraceae). VII. Spatial and temporal patterns of terpenes. **Biochemical Systematics and Ecology**, **27**, 11-25.
- Callaway RM, Pennings SC, Richards CL (2003) Phenotypic plasticity and interactions among plants. **Ecology**, **84**, 1115-1128.
- Carvalho DA (1992) Flora fanerogâmica de campos rupestres da Serra da Bocaina, Minas Gerais: caracterização e lista de espécies. **Ciência e Prática**, **16**, 97-122.
- Caterino MS, Cho S, Sperling FAH (2000) The current state of insect molecular systematic: a thriving tower of Babel. **Annual Review of Entomology**, **45**, 1-54.
- Chan KMA, Levin SA (2005) Leaky prezygotic isolation and porous genomes: rapid introgression of maternally inherited DNA. **Evolution**, **59**, 720-729.
- Charlwood BV, Banthorpe DV (eds). 1991. **Methods in Plant Biochemistry, vol. 7. Terpenoids**. Academic Press, London.
- Cirio U (1971) Reperti sul meccanismo stimolo-risposta nell' ovideposizione del *Dacus oleae* Gmelin (Diptera: Trypetidae). **Redia**, **52**, 577-600.
- Clary DO, Wolstenhome DR (1987) *Drosophila* mitochondrial-DNA – conserved sequences in the A+T-rich region and supporting evidence for a secondary structure model of the small ribosomal –RNA. **Journal of Molecular Evolution**, **25**, 116-125.
- Coley PD, Bryant JP, Chapin III FS (1985) Resource availability and plant anti-herbivore defense. **Science**, **230**, 895-899.

- Comes HP, Abbott RJ (1998) The relative importance of historical events and gene flow on the population structure of a Mediterranean ragwort, *Senecio gallicus* (Asteraceae). **Evolution**, **52**, 355-367.
- Cornell HV, Hawkins BA (2003) Herbivore responses to plant secondary compounds: a test of phytochemical coevolution theory. **The American Naturalist**, **161**, 507-522.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, **144**, 2001-2014.
- Courtney SP, Kibota TT (1990). Mother doesn't know best: selection of hosts by ovipositing insects. In: Bernays EA (ed.) **Insect-Plant Interactions, Vol. II**. Pp. 161-188. CRC Press, Boca Raton.
- Craveiro AA, Alencar JW, Matos FJA, Souza MP, Machado MIL (1989) Volatile constituents of leaves, barks and wood of *Vanillosmopsis arborea* Baker. **Journal of Essential Oil Research**, **1**, 293-294.
- Crawford DJ (1978) Flavonoid chemistry and angiosperm evolution. **The Botanical Review**, **44**, 431-456.
- Cronin JT, Hyland K, Abrahamson WG (2001) The pattern, rate and range of within-patch movement of a stem-galling fly. **Ecological Entomology**, **26**, 16-24.
- Croteau R (1987) Biosynthesis and catabolism of monoterpenes. **Chemical Reviews**, **67**, 829-852.
- Crozier L (2003) Winter warming facilitates range expansion: cold tolerance of the butterfly *Atalopedes campestris*. **Oecologia**, **135**, 648-656.
- Crozier L (2004) Warmer winters drive butterfly range expansion by increasing survivorship. **Ecology**, **85**, 231-241.
- Curado MA, Oliveira CBA, Garcia J, Santos SC, Seraphin JC, Ferri PH (2006) Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**, **67**, 2363-2369.
- de Nettancourt D (2001) **Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants**. Springer-Verlag, Berlin.
- Dempster JP (1989) Insect introductions: natural dispersal and population persistence in insects. **Entomologist**, **108**, 5-13.
- Dicke M (2000) Chemical ecology of host-plant selection by herbivorous arthropods: a multitrophic perspective. **Biochemical Systematics and Ecology**, **28**, 601-607.
- Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J (2004). Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, **135**, 1893-1902.
- Duke SO, Paul Jr RN, Lee MS (1988) Terpenoids from *Artemisia* as potential pesticides. **American Chemistry Society Symposium Series**, **380**, 318-334.
- Eber S, Sturm P, Brandl R (1991) Genetics and morphological variation among biotypes of *Tephritis bardanae*. **Biochemical Systematics and Ecology**, **19**, 549-557.
- Eber S, Brandl R (1997) Genetic differentiation of the tephritid fly *Urophora cardui* in Europe as evidence for its biogeographical history. **Molecular Ecology**, **6**, 651-660.
- Edmunds GF, Alstad DN (1978) Coevolution in insect herbivores and conifers. **Science**, **199**, 941-945.
- Edwards AL, Wyatt R (1994) Population genetics of the rare *Asclepias texana* and its widespread sister species *A. perennis*. **Systematic Botany**, **19**, 291 - 307.
- Eiten G (1992) Natural Brazilian vegetation types and their causes. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **64**, 35-65.
- Emerenciano VP, Rodrigues GV, Alvarenga SAV, Macari PAT (1998) Um novo método para agrupar parâmetros quimiotaconômicos. **Química Nova**, **21**, 125 - 129.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, **14**, 2611-2620.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, **131**, 479-491.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, **1**, 47-50.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, **7**, 574-578.
- Feder JL, Williams SM, Berlocher SH, McPherson BA, Bush GL (1999) The population genetics of the apple maggot fly, *Rhagoletis pomonella* and the snowberry maggot, *R. zephyria*: implications for models of sympatric speciation. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, **90**, 9-24.

- Felsenstein J (1989) PHYLIP -- Phylogeny Inference Package (Version 3.2). **Cladistics**, **5**, 164-166.
- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJC (1997) Composition of the essential oil of *Monizia edulis* Lowe, an endemic species of the Madeira archipelago. **Flavour Fragrance Journal**, **12**, 29-31.
- Fitt GP (1984) Oviposition behavior of two tephritid fruit flies, *Dacus tryoni* and *Dacus jarvisi*, as influenced by the presence of larvae in the host fruit. **Oecologia**, **62**, 37-46.
- Fontellas-Brandalha TML, Zucoloto FS (2004) Selection of oviposition sites by wild *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae) based on the nutritional composition. **Neotropical Entomology**, **33**, 557-62.
- Foote RH, Blanc FL, Norrbom AL (1993) **Handbook of the fruit flies (Diptera: Tephritidae) of America North of Mexico**, Comstock, Ithaca and London.
- Foré SA, Hickey RJ, Vankat JL (1992) Genetic structure after forest fragmentation: a landscape ecology perspective on *Acer Saccharum*. **Canadian Journal of Botany**, **70**, 1659-1668.
- Futuyma DJ, Moreno G (1988) The evolution of ecological specialization. **Annual Review of Ecology and Systematics**, **19**, 207-233.
- Gaete-Eastman C, Figueroa CC, Olivares- Donoso R, Niemeyer HM, Ramírez CC (2004). Diet breadth and its relationship with genetic diversity and differentiation: the case of southern beech aphids (Hemiptera: Aphididae). **Bulletin of Entomological Research**, **94**, 219-227.
- Gaspero G, Guglielmino CR, Malacrida AR, Milani R (1991) Genetic variability and gene flow in geographical populations of *Ceratitis capitata* (Wied) (medfly). **Heredity**, **67**, 347-356.
- Gee JM (2004) Gene flow across a climatic barrier between hybridizing avian species, California and Gambel's quail (*Callipepla californica* and *C. gambelii*) **Evolution**, **58**, 1108-1121.
- Gilbert LE (1979) Development of the theory in the analysis of insect-plant interactions. In: Horn DJ, Stairs GR, Mitchell RD (eds) **Analysis of ecological systems**. Pp. 117-154. Ohio State University, Columbus.
- Girolami V, Strapazzoni A, Crnjar R, Angioy AM, Pietra P, et al. (1986) Behavior and sensory physiology of *Rhagoletis pomonella* in relation to oviposition stimulants and deterrents in fruit. In: Cavalloro R (ed.) **Fruit Flies of Economic Importance** 84. Pp. 183-90. AA Balkema, Rotterdam.
- Giulietti AM, Pirani JR (1988) Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In: Heyer WR, Vanzolini PE (eds) **Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns**. Pp. 39-69. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.
- Giulietti AM (1996) Flora: diversidade, distribuição geográfica e endemismos. In: Fernandes GW (ed.) **Serra do Cipó: ecologia e evolução**. Pp. 84-100. Editora Vozes, Rio de Janeiro.
- Goldenberg H, Kamburov S, Cohen J, Yawetz A (1975) **Migration of the Mediterranean fruit fly in nature in Israel**. Publ. 1124/R2/RB, 1-6. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.
- Gottlieb OR, Kubitzki K (1984) Micromolecular patterns and the evolution and major classification of angiosperms. **Taxon**, **33**, 375 - 391.
- Grayer RJ, Chase MW, Simmonds MSJ (1999) A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: an appreciation of Hegnauer's "Chemotaxonomie der Pflanzen". **Biochemical Systematics and Ecology**, **27**, 369 - 393.
- Grundmann M, Ansell SW, Russell SJ, Koch MA, Vogel JC (2008) Hotspots of diversity in a clonal world — the Mediterranean moss *Pleurochaete squarrosa* in Central Europe. **Molecular Ecology**, **17**, 825-838.
- Haider F, Dwivedi PD, Naqvi AA, Bagchi GD (2004) Influence of transplanting time on essential oil yield and composition in *Artemisia annua* plants grown under the climatic conditions of subtropical north India. **Flavour and Fragrance Journal**, **19**, 51-53.
- Hamrick JL, Godt MJ (1989) Allozyme diversity in plant species. In: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS (eds) **Plant Population Genetics, Breeding and Germplasm Resources**. Pp 43-63. Sinauer, Sunderland.
- Hannover JW (1992) Applications of terpene analysis in forest genetics. **New Forests**, **6**, 159-178.
- Harborne JB (2000) Arsenal for survival: secondary plant products. **Taxon**, **49**, 435 - 449.
- Harborne JB (2001) Twenty-five years of chemical ecology. **Natural Product Reports**, **18**, 361-379
- Harborne JB, Turner BL (1984) **Plant chemosystematics**. Academic Press, London.
- Headrick DH, Goeden RD (1998) The biology of nonfrugivorous fruit flies. **Annual Review of Entomological Society**, **43**, 217-241.

- Heard TA (1995) Oviposition and feeding preferences of a flower feeding weevil, *Coelocephalapion aculeatum*, in relation to conspecific damage to its host plant. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, **76**, 203-209.
- Hertz W (1996) A review of the terpenoid chemistry of the Vernoniaeae. In: Hind DJN, Beentje HJ (eds.) **Compositae: systematics**. Pp 229–251. Whitstable Litho Printers Ltd, London.
- Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguer M, Van der Linden PJ, Dai X, Maskell K, Johnson CA (2001) **Climate Change 2001: The Scientific Basis**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Howell N (1997) mtDNA recombination: what do in vitro data mean? **American Journal of Human Genetics**, **61**, 19-22.
- Hubbs CL (1955) Hybridization between fish species in nature. **Systematic Zoology**, **4**, 1-20.
- Ingvarsson PK, Olsson K (1997) Hierarchical genetic structure and effective population sizes in *Phalacrus substriatus*. **Heredity**, **79**, 153-161.
- Jeanike J (1990) Host specialization in phytophagous insects. **Annual Review of Ecology and Systematics**, **21**, 243-273.
- Jerny T (1966) Feeding inhibitors and food preference in chewing phytophagous insects. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, **9**, 1-12.
- Jerny T (1984) Evolution of insect/host plant relationships. **American Naturalist**, **124**, 609-630
- Jesus FF, Solferini VN, Semir J (2001) Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, **26**, 59-68.
- Jesus FF, Abreu, AG, Semir J, Solferini VN (2009) Low genetic diversity but local genetic differentiation in endemic *Minasia* (Asteraceae) species from Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, **277**, 187-196.
- Kelley ST, Farrell BD, Mitton JB (2000) Effects of specialization on genetic differentiation in sister species of bark beetles. **Heredity**, **84**, 218–227.
- Kelsey RG Stephens JR, Sharizadeh F (1982) The chemical constituents of sagebrush foliage and their isolation. **Journal of Range Management**, **35**, 617-622.
- Kelsey RG (1986) Foliage biomass and crude terpenoid productivity of big sagebrush. In: McArthur ED, Welch BL (comps.) **Proceeding of the Symposium on the biology of Artemisia and Chrysothamnus**. Pp. 375-388. USDA Forest Service General Technical Report INT-200.Provo, Utah.
- Keyghobadi N, Roland J, Strobeck C (1999) Influence of landscape on the population genetic structure of the alpine butterfly *Parnassius smintheus* (Papilionidae). **Molecular Ecology**, **8**, 1481-1495.
- Khanuja SPS, Shasany AK, Pawar A, Lal RK, Darokar MP, Naqvi AA, Rajkumar S, Sundaresan V, Lal N, Kumar S (2005) Essential oil constituents and RAPD markers to establish species relationship in *Cymbopogon* Spreng (Poaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, **33**, 171-186.
- Kimura M, Weiss GH (1964) The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. **Genetics**, **49**, 561-576.
- Kovaleski A, Sugayama RL, Malavasi A (1999) Movement of *Anastrepha fraterculus* from native breeding sites into apple orchards in Southern Brazil. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, **91**, 457-463.
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, **5**, 150-163.
- Landolt PJ (1993) Effects of host plant leaf damage on cabbage looper moth attraction and oviposition. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, **67**, 79-85.
- Langenheim JH (1994) Higher plant terpenoids: phyto-centric overview of their ecological roles. **Journal of Chemical Ecology**, **20**, 1223-1280.
- Lavery S, Moritz C, Fielder DR (1995) Changing patterns of population structure and gene flow at different spatial scales in *Birgus latro* (the coconut crab). **Heredity**, **74**, 531–541.
- Leberg PL (1996) Applications of allozyme electrophoresis in conservation biology. In: Smith TB, Wayne RK (eds.) **Molecular genetics approaches in conservation**. Pp. 87-103. Oxford University Press, New York.
- Lewinsohn TM (1988) **Composição e tamanho de faunas associadas a capítulos de compostas**. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.
- Lunardello MA, Tomaz JC, Vichnewski W, Callegari Lopes JL (1995) Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Eremanthus mattogrossensis* and *Eremanthus eriopus*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, **6**, 307-311.

- Mabry TJ (1970) Intraspecific variation of Sesquiterpene lactones in *Ambrosia* (Compositae): applications to evolutionary problems at the populational level. *In*: Harbone JB. **Phytochemical phylogeny proceedings**. pp. 269 – 298. Academic Press, London.
- MacLeish NFF (1987) Revision of *Eremanthus* (Compositae: Vernonieae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, **74**, 265-290.
- Mangan RL, Frampton ER, Thomas DB, Moreno DS (1997) Application of the maximum pest limit concept to quarantine security standards for the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, **90**, 1433-40
- Mardulyn P, Milinkovitch MC, Pasteels JM (1997) Phylogenetic analyses of DNA and allozyme data suggest that *Gonioctena* leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) experienced convergent evolution in their history of host-plant family shifts. **Systematic Biology**, **46**, 722-747.
- Matos MEO, Souza MP, Matos FJA, Craveiro AA (1988) Sesquiterpenes from *Vanillosmopsis arborea* Baker. **Journal of Natural Products**, **51**, 780-782.
- Mauro MRV, Nasi AMTT, Vichnewski W, Lopes JLC (1993). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, **4**, 31-33.
- McKey D (1979) The distribution of secondary compounds within plants. *In*: Rosenthal GA, Janzen DH (eds) **Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites**. Pp 55-133. Academic Press, New York.
- McPhaden MJ (1999) Genesis and evolution of the 1997-98 El Niño. **Science**, **283**, 950-954.
- Mendonça MP, Lins LV (2000) **Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais**. Fundação Biodiversitas e Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte, Belo Horizonte.
- Menezes MAS, Almeida FRC, Rao VSN, Matos MED (1990) Anti- inflammatory activity in the essential oil of *Vanillosmopsis arborea*. **Fitoterapia**, **61**, 252-254.
- Mitter C, Farrell B (1991) Macroevolutionary aspects of insect-plant relationships. *In*: Bernays E (ed.) **Insect-Plant Interactions**, Vol. 3. Pp. 35-78. CRC Press, Boca Raton
- Mopper S (1996) Adaptive genetic structure in phytophagous insect populations. **Trends in Ecology and Evolution**, **11**, 235-238.
- Mopper S, Simberloff D (1995) Differential herbivory in an oak population: the role of plant phenology and insect performance. **Ecology**, **76**, 1233-1241.
- Mosleh Arany A, de Jong TJ, Kim HK, van Dam NM, Choi YH, Verpoorte R, van der Meijden E (2008) Glucosinolates and other metabolites in the leaves of *Arabidopsis thaliana* from natural populations and their effects on a generalist and a specialist herbivore. **Chemoecology**, **18**, 65-71.
- Murphy RW, Sites JW, Buth DG, Haufler CH (1996) Proteins: isozyme electrophoresis. *In*: Hillis DM, Moritz C, Mable BK (eds.) **Molecular systematics**. Pp. 51-120. 2nd edition. Sinauer Associates, Massachusetts.
- Myers N, Mittermeyer RA, Mittermeyer CG, Fonseca GA, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, **403**, 853-858.
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. **American Naturalist**, **106**, 283-92.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, **89**, 583-590.
- Nei M (1987) **Molecular evolutionary genetics**. Columbia University Press, New York.
- Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, **76**, 5269-5273.
- Nevo E (1990) Molecular evolutionary genetics of isozymes: pattern, theory, and application. *In*: Ogita Z-I, Markert C L (eds) **Isozymes: structure, function, and use in biology and medicine**. Progress in clinical and biological research, 344, 701-742. Wiley-Liss, New York.
- Nufio CR, Papaj DR (2001) Host marking behavior in phytophagous insects and parasitoids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, **99**, 273-293.
- Ochando MD, Reyes A (2000) Genetic population structure in olive fly *Bactrocera oleae* (Gmelin): gene flow and patterns of geographical differentiation. **Journal of Applied Entomology**, **124**, 177-183.
- Oliveira, GS, Satyamurty P (1998) **O El Nino de 1997/98: Evolução e impactos no Brasil**. Anais do X Congresso Brasileiro de Meteorologia, Brasília.
- Oliveira-Filho AT, Vilela EA, Gavilanes ML, Carvalho DA (1994) Comparison of the woody flora and soils of six areas of montane semideciduous forest in southern Minas Gerais, Brazil. **Edinburgh Journal of Botany**, **51**, 355-389.

- Osier TL, Hwang S-Y, Lindroth RL (2000) Within- and between-year variation in early season phytochemistry of quaking aspen (*Populus tremuloides* Michx.) clones. **Biochemical Systematics and Ecology**, **28**, 197-208.
- Osier TL, Lindroth RL (2001) Effects of genotype, nutrient availability, and defoliation on aspen phytochemistry and insect performance. **Journal of Chemical Ecology**, **27**, 1289-313.
- Page RD (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in Bioscience**, **12**, 357-8.
- Paradis A, Elkinton J, Hayhoe K, Buonaccorsi J (2008) Role of winter temperature and climate change on the survival and future range expansion of the hemlock woolly adelgid (*Adelges tsugae*) in eastern North America. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, **13**, 541-554.
- Paradis E, Claude J, Strimmer K (2004) APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. **Bioinformatics**, **20**, 289-290.
- Parmesan C, Yohe G (2003) A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. **Nature**, **421**, 37-42.
- Patitucci ML, Veiga VF, Pinto AC (1995) Utilização de Cromatografia Gasosa de Alta Resolução na detecção de classe de terpenos em extratos brutos. **Química Nova**, **18**, 262-266.
- Peck SL, McQuate GT (2004) Ecological aspects of *Bactrocera latifrons* (Diptera: Tephritidae) on Maui, Hawaii: movement and host preference. **Environmental Entomology**, **33**, 1722-1732.
- Pereyra PC, Bowers MD (1988) Iridoid glycosides as oviposition stimulants for the budkeye, *Junonia coenia* (Nymphalidae). **Journal of Chemical Ecology**, **14**, 917-928.
- Peterson MA, Denno RF (1998a) The influence of dispersal and diet breadth on patterns of genetic isolation by distance in phytophagous insects. **The American Naturalist**, **152**, 428-446.
- Peterson, MA, Denno RF (1998b). Life history strategies and the genetic structure of phytophagous insect populations. In: Mopper S, Strauss S (eds.) **Genetic structure and local adaptation in natural insect populations: Effects of ecology, life history, and behavior**. Pp. 263-322 Chapman & Hall, New York.
- Powers DA, Lauer T, Crawford D, DiMichele L (1991) Genetic mechanisms for adaptation to a changing environment. **Annual Review of Genetics**, **25**, 629-659.
- Prado PIKL, Lewinsohn TM (1994) Genus *Tomoplagia* (Diptera, Tephritidae) in the Serra do Cipó, MG, Brazil: host ranges and notes of taxonomic interest. **Revista Brasileira de Entomologia**, **38**, 669-680.
- Prado PI, Lewinsohn TM, Almeida AM, Norrbom AL, Buys BD, Macedo AC, Lopes MB (2002). The fauna of Tephritidae (Diptera) from capitula of Asteraceae in Brazil. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, **104**, 1007-1028.
- Price PW (1980) Evolutionary biology of parasites. Princeton University Press, Princeton.
- Prokopy RJ (1981) Epideictic pheromones that influence spacing patterns of phytophagous insects. In: Nordlund DA, Jones RL, Lewis WJ (eds) 1981. **Semiochemicals: their role in pest control**. Pp. 181-214. Wiley Press, New York.
- Prokopy RJ, Malavasi A, Morgante JS (1982) Oviposition deterring pheromone in *Anastrepha fraterculus* flies. **Journal of Chemical Ecology**, **8**, 763-721.
- Purdy BG, Bayer RJ, MacDonald SE (1994). Genetic variation, breeding system evolution, and conservation of narrow sand dune endemic *Stellaria arenicola* and the widespread *S. longipes* (Caryophyllaceae). **American Journal of Botany**, **81**, 904 – 911.
- Queiroz R, Souza AG, Santana P, Antunes FZ, Fontes M (1980) **Zoneamento agroclimático do Estado de Minas Gerais**. Viçosa: UFV.
- Raffauf RR, Huang RK, Le Quesne PW, Lavery SB, Brennan TF (1975). Eremantholide A, a novel tumor-inhibiting compound from *Eremanthus elaeagnus* (Compositae). **Journal of the American Chemical Society**, **97**, 6884-6886.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2) population genetic software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, **86**, 248-249.
- Rehill BJ, Whitham TG, Martinsen GD, Schweitzer JA, Bailey J K, Lindroth R L (2006) Developmental trajectories in cottonwood phytochemistry. **Journal of Chemical Ecology**, **32**, 2269-2285.
- Renwick JAA, Radke CD (1981) Host plant constituents as oviposition deterrents for the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, **30**, 201-204.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, **43**, 223-225.

- Riipi M, Ossipov V, Lempa K, Haukioja E, Koricheva J, Ossipova S, Pihlaja K (2002) Seasonal changes in birch leaf chemistry: are there trade-offs between leaf growth and accumulation of phenolics? **Oecologia**, **130**, 380-390.
- Rizzini CT (1997) **Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos**. Âmbito Cultural Edições Ltda., Rio de Janeiro.
- Robinson H (1999) Generic and subtribal classification of American Vernoniae. **Smithsonian Contributions to Botany**, **89**, 1-116.
- Robles C, Garzino S (2000) Intraspecific variability in the essential oil composition of *Cistus monspeliensis* leaves. **Phytochemistry**, **53**, 71-75.
- Roderick GK (1996) Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. **Annual Review of Entomology**, **41**, 325-352.
- Rokas A, Ladoukakis E, Zouros E (2003) Animal mitochondrial DNA recombination revisited. **Trends in Ecology and Evolution**, **18**, 411-417.
- Ronce O, Olivieri I (1997) Evolution of reproductive effort in a metapopulation with local extinctions and ecological succession. **The American Naturalist**, **150**, 220-249.
- Root TL, Price JL, Hall KR, Schneider SH, Rosenzweig C, Pounds JA (2003) Fingerprints of global warming on wild animals and plants. **Nature**, **421**, 57-60.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation-by-distance. **Genetics** **145**: 1219-1228.
- Rousset F (2001) Inferences from spatial population genetics. In: Balding D, Bishop M, Cannings C, (eds.) **Handbook of Statistical Genetics**. Pp. 239-269. John Wiley & Sons, Chichester.
- Rowe CL, Adamowicz SJ, Hebert PDN (2007) Three new cryptic species of the freshwater zooplankton genus *Holopedium* (Crustacea: Branchiopoda: Ctenopoda), revealed by genetic methods. **Zootaxa**, **1656**, 1-49.
- Rudloff EV, Lapp MS (1992) Chemosystematic studies in the genus *Pinus*. VII. The leaf oil terpene composition of ponderosa pine, *Pinus ponderosa*. **Canadian Journal of Botany**, **70**, 374-378.
- Saunders DA, Hobbs HJ, Margules CR (1991) Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. **Conservation Biology**, **5**, 18-27
- Saville BJ, Kohli Y, Anderson JB (1998) mtDNA recombination in a natural population. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, **95**, 1331-1335.b
- Schaffer HE, Sederoff RR (1981) Improved estimation of DNA fragment lengths from agarose gels. **Analytical Biochemistry**, **115**, 113-122
- Schoonhoven LM, Van Loon JJA, Dicke M (2005). **Insect-Plant Biology**. Oxford University Press, Oxford.
- Schwartz M, Vissing J (2002) Paternal inheritance of mitochondrial DNA. **The New England Journal of Medicine**, **8**, 576-580.
- Seaman F, Bohlmann F, Zdero C, Mabry TJ (1990) **Diterpenes in flowering plants; Compositae (Asteraceae)**. Heidelberg, Berlin.
- Semir J (1991) **Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniaeae: Compositae)**. Tese de doutorado. UNICAMP, Campinas.
- Shaw CR, Prasad R (1970) Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. **Biochemical Genetics**, **4**, 297-320.
- Simmonds MSJ (2001) Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. **Phytochemistry**, **56**, 245-252.
- Simon C, Frati F, Beckenback A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994) Evolution, weighting and phylogenetic utility of it gene-sequences and a compilation of conserved polymerase chain-reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, **87**, 651-701.
- Slatkin M, Voelm L (1991) F_{ST} in a hierarchical island model. **Genetics**, **127**, 627-629.
- Skoula M, Gotsiou P, Naxakis G, Johnson CB (1999) A chemosystematic investigation of the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum*. **Phytochemistry**, **52**, 649 – 657.
- Southward AJ, Hawkins SJ, Burrows MT (1995) Seventy years' observations of changes in distribution and abundance of zooplankton and intertidal organisms in the western English Channel in relation to rising sea temperature. **Journal of Thermal Biology**, **20**, 127-155.
- Sperling FAH, Spencer JR, Andersen NM (1997) Mitochondrial DNA, allozymes, morphology and hybrid compatibility in *Limnopus* water striders (Heteroptera: Gerridae): Do they all track species phylogenies? **Annals of the Entomological Society of America**, **90**, 401-415.

- Stiling P, Simberloff D (1989) Leaf abscission: induced defense against pests or response to damage. **Oikos**, **55**, 43-49.
- Straw NA (1989) Taxonomy, attack strategies and host relations in flowerhead Tephritidae: a review. **Ecological Entomology**, **14**, 455-462.
- Sturgeon KB (1979) Monoterpene variation in ponderosa pine xylem resin related to western pine beetle predation. **Evolution**, **33**, 803-814.
- Sun M, Ganders FR (1990) Outcrossing rates and allozyme variation in rayed and rayless morphs of *Bidens pilosa*. **Heredity**, **64**, 139-143.
- Suzuki R, Shimodaira H (2006) **pvclust: Hierarchical Clustering with P-Values via Multiscale Bootstrap Resampling**. R package version 1.2-0. (<http://www.is.titech.ac.jp/~shimo/prog/pvclust/>)
- Theis N, Lerdau M (2003) The evolution of function in plant secondary metabolites. **International Journal of Plant Science**, **164**, S93-S102.
- Thomas CD, Lennon JJ (1999) Birds extend their ranges northwards. **Nature**, **399**, 213.
- Tilley SG, Eriksen RL, Katz LA (2008) Systematics of dusky salamanders, *Desmognathus* (Caudata: Plethodontidae), in the mountain and Piedmont regions of Virginia and North Carolina, USA. **Zoological Journal of the Linnean Society**, **152**, 115-130.
- Travis MJ, Dytham C (1999). Habitat persistence, habitat availability and the evolution of dispersal. **Proceedings of the Royal Society of London B**, **266**, 723-728.
- Trigo JR, Leal IR, Matzenbacher NI, Lewinsohn TM (2003) Chemotaxonomic value of pyrrolidine alkaloids in southern Brazil *Senecio* (Senecioneae: Asteraceae). **Biochemical Systematic Ecology**, **31**, 1011-1022.
- Tsaousis AD, Martin, DP, Ladoukakis ED, Posada D, Zouros E (2005) Widespread recombination in published animal mtDNA sequences. **Molecular Biology and Evolution**, **22**, 925-933.
- Turgeon J, Bernatchez L (2001) Clinal variation at microsatellite loci reveals historical secondary intergradation between glacial races of *Coregonus artedii* (Teleostei: Coregonininae). **Evolution**, **55**, 2274-2286.
- Úrzua A, Santander R, Echeverría J, Rezende MC (2007) Secondary metabolites in the flower heads of *Haplopappus berterii* (Asteraceae) and its relation with insect-attracting mechanisms. **Journal of the Chilean Chemical Society**, **52**, 1142-1144.
- van der Bank FH, Van der Bank M, Van Wyk B-E (2001) A review of the use of allozyme electrophoresis in plant systematics. **Biochemical Systematics and Ecology**, **29**, 469-483.
- van den Dool H, Kratz PD (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gaseliquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, **11**, 463-471.
- Vaupel A, Klinge K, Brändle M, Wissemann V, Tschardt T, Brandl R (2007) Genetic differentiation between populations of the European rose hip fly *Rhagoletis alternata*. **Biological Journal of the Linnean Society**, **90**, 619-625.
- Veloso HP, Rangel Filho ALR, Lima JCA (1991) **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE.
- Velten SB, Garcia QS (2007) Variation between three *Eremanthus* species in their ability to form a seed bank. **Revista Brasileira de Botânica**, **30**, 713-719.
- Verspoor E, Beardmore JA, Consuegra S, Garcí de Léniz C, Hindar K, Jordan WC, Koljonen M-L, Mahkrov AA, Paaver T, Sanchez JA, Skaala Ø, Titov S, Cross TF (2002) Population structure in the Atlantic salmon: insights from 40 years of research into genetic protein variation. **Journal of Fish Biology**, **67**, 3-55.
- Vichnewski W, Gilbert B (1972) Schistosomicidal sesquiterpene from *Eremanthus eleagnus*. **Phytochemistry**, **11**, 2563-2566.
- Vichnewski W, Sarti S, Gilbert B, Herz W (1976). Goyazensolide, a schistosomicidal heliangolide from *Eremanthus goyazensis*. **Phytochemistry**, **15**, 191.
- Vichnewski W, Takahashi AM, Nasi AMTT, Gonçalves DCRG, Dias DA, Callegari Lopes JL, Goedken VL, Gutiérrez AB, Herz W (1989) Sesquiterpene lactones and other constituents from *Eremanthus seidellii*, *E. goyazensis* and *Vanillosmopsis erythropappa*. **Phytochemistry**, **28**, 1441-1451.
- Vogel BS, Wildung MR, Croteau R (1996) Abietadiene synthase from Grand Fir (*Abies grandis*). cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of a bifunctional diterpene cyclase involved in resin acid biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, **271**, 23262-23268.

- Ward JH (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function. **Journal of the American Statistical Association**, **58**, 236-244.
- Walther G-R, Post E, Convey P, Menzel A, Parmesan C, Beebee TJC, Fromentin J-M, Hoegh-Guldberg O, Bairlein F (2002) Ecological responses to recent climate change. **Nature**, **416**, 389-395.
- Weeden NF, Wendel JF (1989) Genetics of plant isozymes. *In*: Soltis DE, Soltis PS (eds.) **Isozymes in Plant Biology**, Pp. 46-72. Dioscorides Press, Portland.
- Weins JA, Cates RG, Rotenberry JT, Cobb N, Van Horne B, Redak RA (1991) Arthropod dynamics on sagebrush (*Artemisia tridentata*): effects of plant chemistry and avian predation. **Ecological Monographs**, **61**, 299-321.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, **38**, 1358-1370.
- White IM (1988) **Tephritid flies (Diptera :Tephritidae). Handbooks for the identification of British insects Vol. 10 (5a)**. Royal Entomological Society of London, Londres.
- Whitham TG, Mopper S (1985) Chronic herbivory – impacts on architecture and sex expression in pinyon pine. **Science**, **228**, 1089-1091.
- Williams JB, Lee RE (2008) Differences in cold tolerance, desiccation resistance, and cryoprotectant production between three populations of *Eurosta solidaginis* collected from different latitudes. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, **178**, 365-375.
- Wink M (1988) Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. **Theoretical and Applied Genetics**, **75**, 225-233.
- Wirtz P (1999). Mother species–father species: unidirectional hybridization in animals with female choice. **Animal Behaviour**, **58**, 1-12.
- Wright S (1946) Isolation by distance under diverse systems of mating. **Genetics**, **31**, 39-59
- Young A, Boyle T, Brown T (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, **11**, 413-418.
- Zar JH (1996) **Biostatistical Analysis**, 3rd ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Zhao X, Li N, Guo W, Hu X, Liu Z, Gong G, Wang A, Feng J, Wu C (2004) Further evidence for paternal inheritance of mitochondrial DNA in the sheep (*Ovis aries*). **Heredity**, **93**, 399-403.
- Zitarti-Chatti R, Chatti N, Elouaer A, Said K (2008) Genetic variation and population structure of the caridean prawn *Penaeus kerathurus* (Forskäl) from the eastern and western Mediterranean coasts in Tunisia. **Aquaculture research**, **39**, 70-76.
- Zouros E, Freeman KR, Ball AO, Pogson GH (1992) Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. **Nature**, **359**, 412-414.
- Zwölfer H (1982) Life systems and strategies of resource exploitation in tephritids. *In*: Cavalloro R (ed.). **Fruit flies of economic importance**. Pp. 16-30. A. A. Balkema, Rotterdam.

Anexo 1: Composição quantitativa relativa de sesqui e diterpenos em 46 indivíduos de *Eremanthus glomerulatus*.

Geral	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
1869																	0,59							
1848																								
1815	5,34					1,54				1,53							1,04							
1800																								
1703																	0,47							
1698		4,3	4,78	5,53	5,68	3,69	5,39	4,7	5,11	3,04	5,61	5,85	4,86	4,1	5,52	5,38	4,28	5,53	4,87	4,17	3,52	4,03	3,02	
1693																								
1684	1,61					2,47		0,95	0,8	1,74						0,85	0,81				1,75		2,1	
1675	3,27				2,73		2,73			2,06					0,87	2,68	0,53	2,63		2,23	1,87		0,32	
1674		2,26	2,49	2,69		1,76		2,4	2,72		2,9	3,03	2,5	2,07	2,5		2,12		2,76			2,11	1,57	
1670	1,52	1,46		2,13	2,07	1,35	2,05	1,83	1,85	1,4		1,86	1,8	1,46	2	1,94	1,6	1,67	1,5	1,61	1,33		1,38	
1663								0,8	0,83	0,56					0,84	0,87	0,64						0,48	
1660	2,12	2,03	2	2,4	2,42	1,6	2,18	2,04	2,14	1,41	1,87	2,43	2,02	1,74	2,4	2,25	1,79	2,29	1,98	1,8	1,55	1,82	1,39	
1653	20,21	16,22	16,96	19,48	21,67	14,44	18,73	17,15	18,79	10,95	20,47	20,19	19,39	15,13			16,99	19,85	18,44	15	12,9	14,3	11,37	
1645	1,94	2,08	1,77	2,22	2,39	1,83	2,21	2,11	2,22	1,56	2,1	2,27	2,21	1,76	2,4	2,41	2,08	2,01	1,93	1,81	1,69	1,76	1,51	
1641	8,87	7,74	7,3	8,42	9,4	6,93	8,31	7,58	8,15	5,4	8,7	8,6	8,27	6,75	8,87	8,67	7,41	8,29	7,9	6,55	6,22	6,31	5,69	
1637										0,61														
1634	2,26	2,67	1,78	2,4	2,61	1,99	2,69	2,05	2,12	1,52	2,68	2,43	2,11	1,94	2,43	2,51	1,99	2,13	1,98	1,79	1,85	2,1	1,72	
1631		1,23		1,39	1,28	1,07	1,42		1,26	0,93			1,17	1,06	1,39	1,42	1,18	1,16			0,93	1,11	0,85	
1627						0,71									0,94	0,95	0,67						0,5	
1619															0,71	1,07	0,68							
1616	8,03	6,58	7,05	8,28	8,77	5,91	8,03	7,21	7,86	4,53	8,25	8,35	7,93	6,02	0,88	8,32	6,91	8,24	7,26	6,26	5,23		4,62	
1609																								
1608	2,44	2,33	2,31	2,86	2,67	1,99	2,69	2,41	2,52	1,77	2,4	2,6	2,32	2,08	2,78	2,78	2,19	2,5	2,11	2,23	1,86	2,23	1,71	
1600	1,6	1,83		1,68	1,72	1,41	1,61	1,8	1,7	1,34		2,13	1,61	1,74	2,36	2,21	1,71	1,65	1,84	1,64	1,3	1,62	1,27	
1590				8,62		0,97		1,06	1,04	0,73			1,21	0,85	1,21	1,37	1,34	1,07		1,06	0,8	0,97	0,72	
1589	9,89	7,1	7,67		10,68	6,17	8,34	7,52	8,43	4,7	8,88	9,2	8,55	6,78	8,49	8,78	7,52	8,92	7,93	6,56	5,63	6,56	4,84	
1586					1,12	0,82		1	1,11				1,04	0,85	1,23	1,2		0,96		0,87			0,69	
1581	5,33	1,58	4,81	5,57	5,57	4,38	5,17	4,47	4,87	3,15	5,13	5,62	5,08	4,59	5,33	5,62	4,43	5,08	4,48	4,33	3,42	4,51	3,1	
1580		1,95																						
1577								0,94	1,06	0,69		1,2	0,83	0,76	0,83	0,88	0,76	0,9		0,78			0,51	
1576	5,64	5,52	5,74	5,35	4,83	4,91	4,33	4,37	4,49	3,69	4,54	6,36	4,47	6,19	7,73	6,24	4,59	3,73	4,4	5,53	3,91	0,95	3,89	
1565		1,41		1,52	1,62	1,12	1,51		1,64	1,12				1,35	1,1	1,44	1,56	1,3	1,33	1,29	1,21	1,04	1,14	0,96

Geral	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1560																							
1549																							
1538																							
1534																							
1523	2,96	3,161		3,43	2,63	2,68	3	3,34	3,4	3,69	4,82	2,14	2,32	3,35	5,05	3,25	2,3	2,77	3,48	3,08	3,31	2,54	2,95
1518			3,7																				
1513		1,39				2,12		1,47	1,15	2,29				0,88	0,93		0,8			0,88	1,97		2,21
1508																							
1499						0,83		0,87	1,06	0,97			0,73	0,77	0,87	1,74	0,8	0,8	1,42	0,82	0,9		1,17
1495		1,69				1,06		1,36		3,21			3,66	5,88	11,12	4,59	3,31			5,01	5,28	18,37	3,76
1493		2,27	11,17			0,81		0,94	0,8	1,49													0,49
1480	4,23	5,94	6,24	5,27	3,16	8,67	5,35	8,07	4,19	14,77	8,74	1,93		4,73	3,03	4,63	5,14	2,89	8,06	7,32	17,5		17,14
1476										0,94			4,22									9,94	0,55
1475																							
1458														0,97	1,47	0,91						1,23	
1455											2,04												
1452	1,75	2,31	2,83	1,95	1,27	2,93	3,36	2,22	1,59	3,09	2,24	2,27	2,11	3,19	3,13	2,09	2,76	2,5	2,35	2,89	2,32	3,93	2,82
1447																							
1427										0,53													0,43
1418	10,97	11,83	11,39	8,79	5,71	10,59	10,93	8,39	7,11	9,82	10,68	7,78	8,24	11,35	10,04	11,37	8,7	9,93	9,73	12,82	8,73	12,46	9,6
1400								0,97		1,25		1,74		0,68		1,46	0,56	1,16	4,29	1,03			0,93
1389						0,75				1,08											1,22		1,27
1383		2,12				1,75				1,54										0,73	0,87		1,62
1375						0,74				0,91				1,24	1,23						1,07		0,82

Continuação do anexo I.

Geral	24	25	26	28	29	30	31	32	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
1869																	0,66			0,43			
1848							0,44																
1815			1,11				2,16					0,89	1,42	1,41	2,63			1,1	1,59		0,89		
1800																			1,8				
1703							0,81																
1698	4,11	4,53	3,29	3,2	3,94	5,36	2,51	4,63	3,99	4,81	4,58	3,75	3,72	4,32	3,09	4,99	4	4,51	2,7	3,96	4,4	4,41	4,94
1693																				0,4			
1684		1,08	2,25		0,78		1,21					1,15	1,05		0,94	1,08	0,69			0,58		0,67	
1675		2,88	1,5								2,19	1,96	0,62	2,32	0,54	2,6	2,64	2,89	1,99	2,71	2,94	2,83	2,96
1674	2,01				2,51	2,48	1,25	2,43	1,99	2,48					1,8								
1670	1,7	1,81	1,17	1,31	1,73	1,66	0,94	1,78	1,43	1,66		1,5	1,49	1,82	1,36		1,41	1,83	3,75	1,71	1,78	1,72	1,9
1663		0,69						0,74	0,6			0,69	0,6				0,65			0,71		0,72	0,7
1660	1,74	1,97	1,51	1,44	1,7	2,16	1,1	2,04	1,72	2,07	1,88	1,75	1,67	1,97	1,38	2,15	1,75	2,02	1,16	1,81	2,06	1,97	2,05
1653	15,97	16,59	12,37	11,57	16,46	19,59	9,83	16,52	14,23	17,3	17,06	13,73	14,77	15,51	11,97	18,74	14,04	15,41	9,49	14,39	15,89	15,49	17,82
1645	1,79	1,98	1,64	1,51	1,96	2,04	1,29	1,97	1,63	1,99	1,75	1,73	1,95	2,05	1,49	2,29	1,77	2,08	1,52	1,88	2,03	1,95	2,09
1641	6,87	7,44	5,95	5,32	7,24	8,45	4,95	7,19	6,31	7,6	7,31		6,98	6,91	6,03	8,41	6,3	6,9	5,4		7,03	6,95	7,54
1637																			1,06	0,54			
1634	2,06	2,14	1,85	1,43	1,91	2,21	1,43	1,98	1,61	2,13	1,7	2,15	1,71	2,17	1,45	2,36	1,74	1,94	1,12	1,73	2,32	2,2	2,24
1631	1,03	1,14	1,1		1,04		0,69	1,15	0,93	1,16	0,93	1,12	1,04	1,21	0,87	1,31	1,02	1,21	1,07		1,12	1,14	1,22
1627							0,42					0,72	0,78		0,69		0,68		1,54	0,62		0,64	
1619												0,66								0,57			
1616	6,39	7,07	4,93	4,86	6,52	7,98	3,64	6,95	5,88	7,24	6,95	5,77	5,67	6,41	4,69	7,64	5,74	6,55	12,92	6,26	6,69	6,62	7,53
1609																	0,69						
1608	2,09	2,23	1,81	1,96	2,1	2,41	1,31	2,37	1,98	2,33	2,1	2,21	1,97	2,38	1,66	2,6	2,22	2,52	2,23	2,32	2,48	2,41	2,6
1600	1,56	1,55	1,38	1,62	1,7	1,6	0,99	1,63	1,4	1,67	1,48	1,74	1,91	1,57	1,66	1,98	1,75	1,55	5,3	1,66	1,62	1,64	1,92
1590	1	1	0,88	0,8	0,88		0,52	0,97	0,77	1,01	0,96	0,84	0,97	1,05	0,83	1,19	0,81	0,91	1,53	0,88	0,87	0,83	0,9
1589	6,93	7,58	5,12	4,96	7,15	8,46	4,03	7,18	6,08	7,55	7,27	6,02	6,05	6,7	4,8	8,09	6,11	6,71	4,69	6,48	6,93	6,76	8,06
1586	0,84	0,99	0,7	0,73	0,88		0,48	0,87	0,74	0,9	0,78	0,93	0,77	0,88	0,66	1,03	0,86	1,01		0,97	1,02	0,9	1,05
1581	4,74	4,19	3,6	3,41	4,95	4,55	2,61	4,18	3,4	4,11	3,96	3,73	3,68	4,15	3,09	5,19	3,84	4,17	2,79	4,06	4,38	4,02	5,04
1580																							
1577	0,97	0,92	0,68		1,03		0,41	0,78	0,58			0,68	0,77		0,6	0,91	0,87	0,87		0,98	1,1	0,79	1,18
1576	6,39	3,75	4,06	3,51	6,33	3,62	3,08	3,14	2,66	3,28	3,09	4,17	3,59	3,62	3,33	4,97	4,25	3,86	2,27	3,82	3,79	3,91	3,71

Geral	24	25	26	28	29	30	31	32	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
1565	1,09	1,27	1,1	1,01	1,18		0,69	1,29	1,01	1,23	1,04	1,27	1,11	1,24	0,87	1,53	1,2	1,41	4,97	1,39	1,49	1,32	1,62
1560																			1,27				
1549																			0,97				
1538															0,85				0,97				
1534												0,65	0,82						3,86				
1523	2,62	2,93	2,72	5,03	2,83	4,75	3,31	4,4	5	4,16	4,83	4,2	4,95	4,41	5,92	4,44	5,61	3,99	4,34	4,05	4,55	4,18	3,58
1518																			1,94				
1513		1,12	2,2	1,23			2,04		0,79			2,07	1,76	1,14	2,17		1,61	1,03		1,2	1,19	1,05	
1508																	0,53						
1499		0,99	0,89	1,49	0,72		0,77	0,98	0,79		0,87	1,2	0,83	0,96	1,19	1,35	1,06	1,15	1,54	1,09	1,23	1,12	1,79
1495	7,54	1,77	2,29	2,18	1,82		4,55	1,39	2,54	1,64	1,1	2,29	1,47	1,33	2,59		0,69	1,13		1,59		1,11	
1493			0,96				0,84		0,62			1,03	0,71		1,11		0,94	0,68		0,53	0,83	0,8	
1480	4,69	9,97	12,49	8,8	6,34	6,26	19,8	5,69	8,23	7,04	5,74	12,45	7,78	6,5	10,38	4,79	6,94	8,61	2	7,66	5,11	7,79	2,99
1476			0,76	0,76			0,69					0,71	0,68		0,79					0,47			
1475				1,76																			
1458				0,99					1			0,76	0,91		0,87		1,12			0,84	1,83		
1455																	0,9		1,25	0,64			
1452	3,62	1,98	3,6	6,19	3,3	3,48	5,01	3,48	4,4	3,13	4,86	3,35	2,45	3,91	3,48	2,05	2,58	3,25	1,47	4,51	3,08	2,87	2,53
1447																			1,64				
1427																							
1418	11,47	8,44	11,72	19,26	12,2	12,95	13,8	13,25	15,85	12,19	16,54	10,36	8,43	12,84	10,81	8,32	9,09	10,4	4,95	14,48	10,25	10,35	10,28
1400	0,81		1,08	1,58	0,8								0,94						0,95				1,77
1389			0,89				0,9					0,75					0,67			0,68			
1383			1,74				0,75						0,61		1		0,64						
1375			0,76	2,11			0,73	1,03	1,84	1,34	1,04	1,29	1,59	1,21	2,52		1,91		1,96	1,41	1,11	0,83	
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	98	100	100	100	100	100