

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

mestrado

BC/56429

IB/ 82018

INSTITUTO DE BIOLOGIA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS-UNICAMP
INSTITUTO DE BIOLOGIA-IB

Aluana Gonçalves de Abreu

20.553.293

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE DUAS ESPÉCIES
CRÍPTICAS DE *Tomoplagia* (DIPTERA:TEPHRITIDAE)**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Aluana Gonçalves de Abreu e aprovada pela Comissão Julgadora.

Vera Nisaka Solferini

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular na área de Genética Animal e Evolução.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini

Setembro/2003

UNIDADE = 7 / 8 2018
Nº CHAMADA
V. _____ EX _____
TOMBO BC 38727
PROC. _____
C D
PREÇO _____
DATA _____
Nº CPD _____

38727

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

Ab86c

Abreu, Aluana Gonçalves de

Caracterização genética de duas espécies crípticas de *Tomoplagia*
(Diptera: Tephridae) / Aluana Gonçalves de Abreu.--
Campinas, SP: [s.n.], 2003.

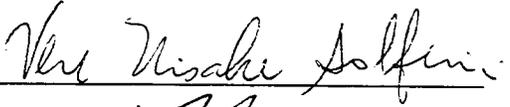
Orientadora: Vera Nisaka Solferini

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas .
Instituto de Biologia.

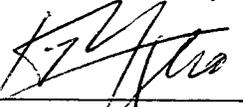
1. Biologia molecular. 2. Genética animal. 3. Genética de populações.
I. Solferini, Vera Nisaka. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

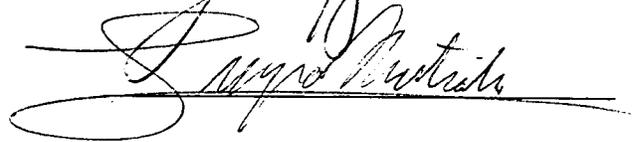
Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini



Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko



Prof. Dr. Sergio Russo Matioli



Profa. Dra. Ana Maria de Azeredo Espin

AGRADECIMENTOS

Aos membros da minha pré-banca, Profa. Denise Selivon Scheepmaker, Prof. Sergio Russo Matioli e Prof. Angelo Pires do Prado pelas críticas e discussões construtivas.

Aos membros da minha banca Prof. Louis Bernard Klaczko, Prof. Sergio Russo Matioli e minha orientadora Profa. Vera Nisaka Solferini.

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

Ao Prof. Thomas Michael Lewinsohn e Paulo Inácio Prado pela colaboração no desenvolvimento do trabalho.

À Profa. Ana Maria de Azeredo Espin por ceder seu laboratório e à Rosângela Aparecida Rodrigues por ensinar a técnica de RFLP.

À Eduardo Kickhofen, pelos desenhos das genitálias das moscas.

À Karla, pelo apoio técnico e logístico, pelas discussões produtivas, pelas sugestões, pela ajuda sempre disponível.

Ao pessoal do lab, Karla, Ju, Tiburcio, Tereza, Evandro, Karina, Teresa, Flávia, Gustavo, Flavio, Suzana, Sônia, Claudemir, Renato pelo convívio diário.

Às pessoas que me ajudaram nas coletas, Herberth, Karla, Horácio, Suzana, Teresa e minha mãe.

A todas as pessoas com as quais morei (que foram muitas) ou ainda moro.

Aos amigos, Patricia, Miúdo, Yu, Ju, Rodrigo, Cintia, Renato, Kubota, Karla, Tereza, Mário, Fábio, turma 97D e agregados.

Ao Marcio, pelo apoio, pela companhia, pelo carinho, pela atenção.

À minha família, minhas irmãs (Maira e Tainara), meus avós (João, Dinorá, Geni), meu padrasto (Carlos), meu pai (Laércio) e minha mãe (Giselda).

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos ao longo do mestrado.

À FAPESP, pelo apoio financeiro ao projeto. Este trabalho é parte integrante do projeto temático “Species and interaction diversity in plants and phytophagous insects” (FAPESP-98/05085-2).

ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO GERAL.....	3
ORGANISMO ESTUDADO.....	3
METODOLOGIAS UTILIZADAS.....	5
ISOZIMAS.....	5
RFLP DO DNA MITOCONDRIAL.....	6
CAPÍTULO 1 – RELAÇÕES INTRA E INTERESPECÍFICAS EM DUAS ESPÉCIES CRÍPTICAS DE TEPHRITIDAE INFERIDAS POR ISOZIMAS	
INTRODUÇÃO.....	9
OBJETIVOS.....	10
MATERIAL E MÉTODOS.....	11
PONTOS DE COLETA.....	11
TRATAMENTO DOS INSETOS.....	11
PROCEDIMENTOS DE ELETROFORESE.....	12
EXTRAÇÃO.....	12
APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	12
COLORAÇÃO.....	12
ANÁLISES UTILIZADAS.....	13
RESULTADOS.....	14
DISCUSSÃO.....	28
DETECÇÃO DE DUAS ESPÉCIES CRÍPTICAS EM TEPHRITIDAE.....	28
VARIABILIDADE GENÉTICA EM DUAS ESPÉCIES CRÍPTICAS DE <i>Tomoplagia</i>	31

CAPÍTULO 2 – RELAÇÕES ENTRE DUAS ESPÉCIES CRÍPTICAS DE TEPHRITIDAE
INFERIDAS POR RFLP.

INTRODUÇÃO.....	35
OBJETIVOS.....	36
MATERIAL E MÉTODOS.....	36
PONTOS DE COLETA.....	36
TRATAMENTO DOS INSETOS.....	37
ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL.....	38
EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL.....	38
A ESCOLHA DO GENE.....	38
AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO COI/COII.....	39
ANÁLISE DO MTDNA COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO.....	39
ANÁLISE DA DIVERGÊNCIA DE SEQUÊNCIA DO MTDNA ENTRE POPULAÇÕES.....	40
RESULTADOS.....	42
DISCUSSÃO.....	53
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

Resumo

Tomoplagia é um gênero neotropical de Tephritidae (Diptera) cujas fêmeas ovipõem em inflorescências de Asteraceae. Este gênero está primariamente associado à subtribo Vernoniinae mas algumas espécies ocorrem em plantas de outras subtribos. Uma destas espécies associadas à outra subtribo (Lychnophorinae) é o organismo de estudo deste trabalho. Ela estava sendo descrita como *T. sp1* e apresentava variação na coloração do corpo, de laranja (escuro) a amarelo (claro). O objetivo deste trabalho foi verificar se os morfos claro e escuro de *T. sp1* representam variação intraespecífica ou espécies crípticas e caracterizar sua variabilidade genética através de eletroforese de isozimas e RFLP dos genes citocromo oxidase I e II do DNA mitocondrial. No capítulo 1 (isozimas), houve evidências de que os morfos claro e escuro de *T. sp1* pertencem a espécies distintas. Doravante, o morfo escuro será referido como *T. sp1* e o morfo claro como *T. sp2*. A variabilidade genética foi investigada nos dois capítulos (dois marcadores) e os resultados são congruentes. *T. sp1* apresentou uma alta variabilidade genética, maior que a de *T. sp2*. Entretanto, não foi possível estabelecer que fatores geraram essa baixa variabilidade em *T. sp2*. Outros estudos poderão esclarecer que processos estão gerando esse padrão. *T. sp1* teve também uma maior estruturação populacional que *T. sp2*. Isso pode ser resultado de barreiras físicas (vegetação e relevo) ao fluxo gênico mais intensas. Houve indícios de introgressão entre *T. sp1* e *T. sp2*. Esse fato foi verificado tanto com isozimas quanto com RFLP, na coleta em que as duas espécies ocorreram juntas, o que fortalece a hipótese de introgressão. Apesar desta hibridação, algum tipo de isolamento reprodutivo parece estar mantendo a integridade genética das espécies. Estudos futuros podem esclarecer se também há alguma barreira comportamental entre elas.

Abstract

Tomoplagia is a neotropical genus of Tephritidae (Diptera) whose females oviposit in Asteraceae's flowerheads. This genus is primarily associated to the subtribe Vernoniinae but some species occur in plants of other subtribes. One of these species associated to another subtribe (Lychnophorinae) is the target organism of this work. It has been described as *T. sp1* and showed body color variation from orange (dark) to yellow (light). This work's goal was to ascertain if the dark and light morphotypes of *T. sp1* are intraspecific variation or sibling species and to characterize their genetic variability, through isozymes and RFLP of the genes cytochrome oxidase I and II (mtDNA). In chapter 1 (isozymes), there were evidences that the dark and light morphotypes of *T. sp1* belong to distinct species. We suggest that the dark morphotype stay named as *T. sp1* and the light one be named as *T. sp2*. The genetic variability was surveyed in both chapters and the results are congruent. *T. sp1* had a high genetic variability, bigger than *T. sp2*. However, it was not possible to establish which factors generated the low genetic variability in *T. sp2*. Other studies may clarify which processes are generating this pattern. *T. sp1* also had a higher population structure than *T. sp2*. This can be the result of stronger physical barriers (vegetation and relief) to gene flow. There were clues of introgression between *T. sp1* e *T. sp2*. This fact was verified through both allozymes and RFLP, in the sample in which both species occurred together, what reinforce the hypothesis of introgression. Besides this hybridization, some kind of reproductive isolation seems to keep the genetic integrity of the species. Future works may clarify if there is also a behavior isolation between them.

INTRODUÇÃO GERAL

Organismo estudado

Um inseto é considerado fitófago se em alguma etapa de seu ciclo de desenvolvimento se alimenta de tecidos vegetais vivos ou de seiva, excluindo-se pólen e néctar (Jermy 1984). Esses insetos representam quase um quarto de todas as espécies de eucariotos e são extraordinariamente diversos em biomas tropicais e temperados (Bernays 1998).

Moscas da família Tephritidae, uma das maiores de Diptera, são um exemplo de fitófagos. Esta família está distribuída nas regiões temperada, subtropical e tropical com a maior diversidade de espécies ocorrendo nos trópicos (Foote *et al.* 1993, Headrick & Goeden 1998).

Três subfamílias de tefritídeos são reconhecidas: Dacinae, Trypetinae e Tephritinae. As larvas das subfamílias Dacinae e Trypetinae usam predominantemente os frutos carnosos de seus hospedeiros como fonte de alimento. Já as larvas de Tephritinae usam preferencialmente a parte vegetativa e capítulos dos hospedeiros para esse fim (Foote *et al.* 1993, Headrick & Goeden 1998). As espécies que infestam capítulos alimentam-se de flores, aquênios e/ou de tecidos do receptáculo (Headrick & Goeden 1998).

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).

Segundo Zwölfer (1983), o grande número de hospedeiros em potencial com vários tipos de inflorescências, a estabilidade e a previsibilidade da fonte de alimento e a pressão dos competidores gerou uma alta taxa de especiação combinada com um alto grau de especialização ecológica e divisão de nicho que ultrapassam os encontrados em tefritídeos frugívoros.

Tomoplagia (Coquillet), um gênero neotropical de Tephritinae, possui 47 espécies descritas (Norrbom *et al.* 1998). As fêmeas deste gênero ovipõem nas inflorescências das compostas, onde as larvas parasitas endófagas se desenvolvem.

Segundo Prado & Lewinsohn (1994), *Tomoplagia* está primariamente associado à subtribo Vernoniinae. Entretanto, seis espécies deste gênero são encontradas em plantas dos gêneros *Eremanthus* e *Lychnophora* (subtribo Lychnophorinae) (Prado *et al.* 2002). Os fatores envolvidos na escolha do hospedeiro e distribuição das espécies deste gênero ainda não são bem claros mas as características da planta sem dúvida exercem grande influência (Prado & Lewinsohn 1994).

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). A floração e a frutificação ocorrem de março a outubro (MacLeish 1987). *Lychnophora* Mart. compreende 34 espécies (Robinson 1999) e é considerado um gênero endêmico do Brasil, tendo uma distribuição restrita aos complexos rupestres de quartzito da Bahia, Goiás e Minas Gerais (Semir 1991). As espécies de *Lychnophora* geralmente apresentam populações disjuntas em várias localidades, excluindo-se aquelas de distribuição restrita (Semir 1991).

Lychnophora e *Eremanthus* podem exibir uma série de sobreposições em relação à forma, consistência e bainha das folhas, hábito, indumento e inflorescência (Semir 1991). Entretanto, estes gêneros mantêm-se distintos em uma série de caracteres, principalmente nos referentes aos hábitos, padrões de inflorescências e aquênios (Semir 1991). Os dois gêneros ocorrem em ecossistemas diferentes. *Eremanthus* parece ter se diversificado principalmente nos cerrados, com algumas espécies estabelecendo-se nos complexos rupestres. Ao contrário, *Lychnophora* é observada quase que exclusivamente nos complexos rupestres de quartzito, com algumas espécies ocorrendo nos ecótonos campo rupestre-cerrado destas formações vegetais (Semir 1991).

Uma destas espécies de *Tomoplagia* associada à subtribo Lychnophorinae, *T. sp1*, apresentou variação na coloração do corpo dos indivíduos. Questionou-se então qual a origem dessa variação: polimorfismo intraespecífico ou espécies diferentes.

Metodologias empregadas

1) Isozimas

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 na década de 60, 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 seqüência de DNA e a modificação pós-traducional das isozimas (Leberg 1996).

Várias pesquisas têm enfatizado a eficiência de enzimas para a estimativa e entendimento da variabilidade genética em populações naturais, fluxo gênico, hibridação, reconhecimento de limites de espécies e relações filogenéticas, entre outros problemas (Murphy *et al.* 1996). Em estudos de taxonomia e sistemática, o uso de dados eletroforéticos é essencialmente limitado a duas áreas principais: distinguir ou confirmar espécies e medir a divergência entre populações da mesma espécie ou de gêneros próximos (Van der Bank *et al.* 2001). Apesar de atualmente serem menos usadas para a reconstrução de filogenias interespecíficas (Sperling *et al.* 1997; Mandulyn *et al.* 1997), isozimas têm se mantido uma referência em estudos de estrutura populacional e limite de espécies (Pinto *et al.* 1997; Bellows *et al.* 1994).

Na distinção de espécies, esta técnica tem sido útil na análise de morfotipos simpátricos entre em uma grande variedade de organismos, muitos deles invertebrados (Thorpe & Solé-Cava 1994). O uso de técnicas moleculares na criação ou modificação da nomenclatura formal é limitado. Há atualmente poucas descrições de espécies baseadas, pelo menos em parte, em dados moleculares (Norwak & Lanteri 1996; Pinto *et al.* 1997; Bellows 1994).

2) RFLP do DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial (mtDNA) apresenta atributos de um marcador molecular ideal para análise filogenética: é característico, de forma que comparações homólogas garantidas podem ser feitas entre uma variedade de organismos; é fácil de isolar e manipular; tem uma estrutura genética simples sem aspectos complicadores como DNA repetitivo, elementos de transposição, pseudogenes e íntrons; exhibe um modo de transmissão direto, 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 apresenta algumas limitações que devem ser consideradas como: heteroplasmia, homoplasia e desvio de amostragem devido a herança materna (Avisé *et al.* 1987).

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 eletroforese de isozimas e 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). Dentro 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).

Capítulo 1 - Relações intra e interespecíficas em duas espécies crípticas de Tephritidae inferidas por isozimas

INTRODUÇÃO

Tomoplagia (Coquillet) é um gênero neotropical de Tephritidae com 47 espécies descritas (Norrbom *et al.* 1998). Ele pertence à subfamília Tephritinae, cujas larvas alimentam-se da parte vegetativa e dos capítulos de Asteraceae (Foote *et al.* 1993, Headrick & Goeden 1998).

Tomoplagia está primariamente associada à plantas da subtribo Vernoniinae (Prado & Lewinsohn 1994). Entretanto, seis espécies deste gênero são encontradas em *Eremanthus* e *Lychnophora*, representantes da subtribo Lychnophorinae (Prado *et al.* 2002).

Uma destas espécies de *Tomoplagia* associadas à subtribo Lychnophorinae estava sendo descrita como *T.sp1*. Esta espécie tem o gênero *Eremanthus* como hospedeiro principal, com eventos raros de ocorrência em *Lychnophora*. Das coletas de *Eremanthus* emergem centenas de indivíduos enquanto de *Lychnophora* emergem somente um ou dois indivíduos.

Os indivíduos que emergiram das coletas de *Eremanthus* apresentavam variação na coloração do corpo, de laranja a amarelo. Como a maioria das espécies deste gênero foi descrita a partir de poucos espécimes, a variabilidade intra e interpopulacional dos caracteres sistemáticos recebeu pouca atenção (Prado & Lewinsohn 1994). Assim, essa variação foi ignorada e considerada polimorfismo.

Todas as coletas de *T.sp1* até 1999 foram realizadas em Santana do Riacho (Serra do Cipó-MG). Nesse local ocorrem principalmente indivíduos com corpo laranja, o

morfo escuro. A ocorrência de indivíduos amarelos (morfo claro) neste local é bem rara. Esse foi um dos motivos que levaram a considerar a variação na coloração como polimorfismo. No ano de 1999, não se obtiveram moscas das coletas da Serra do Cipó. Como a distribuição de *Eremanthus* estende-se até Goiás, tentou-se obtê-las de coletas deste local. Os indivíduos que emergiram dos capítulos do Centro-Oeste eram todos amarelos (morfo claro). Em 2000, coletou-se novamente no Cipó e emergiram tanto indivíduos claros quanto escuros. Entretanto, em 2001 e 2002 emergiram somente moscas escuras. No Centro-Oeste, em todos os anos coletados, emergiram apenas indivíduos claros.

Com esse grande número de indivíduos claros, tanto no Centro-Oeste quanto em Minas Gerais, pode-se comparar melhor os morfos. Nesta comparação, a diferença de coloração entre eles ficou evidente. Questionou-se, então, se a hipótese de variação intraespecífica era válida ou se os morfos eram espécies distintas, caracterizando espécies crípticas segundo Mayr (1963).

OBJETIVOS

- a) verificar se os morfos claro e escuro de *T. sp1* representam variação intraespecífica ou espécies crípticas.
- b) caracterizar e comparar a variabilidade genética dos dois morfos de *T. sp1*.

MATERIAL E MÉTODOS

Pontos de coleta

As coletas foram realizadas de 1999 a 2002, nos municípios de Brasília (DF), Pirenópolis (GO), Anápolis (GO) e Santana do Riacho (Serra do Cipó-MG) (tabela1). Foram coletados capítulos dos gêneros *Eremanthus* e *Lychnophora* mas somente emergiram indivíduos em número suficiente de *Eremanthus*. Das coletas do Centro-Oeste (Brasília e Goiás) emergiram apenas indivíduos claros e do Cipó emergiram indivíduos escuros em todas as populações e claros somente em Cipó-1 e Cipó-2.

Tabela 1: Localização das coletas e número de indivíduos utilizados na análise.

Nome	Local	Data de coleta	Coordenadas	Nº de indivíduos
Brasília-1	Brasília (DF)	08/08/1999	15° 36' 24"S 47° 34' 32"W	55
Brasília-2	Brasília (DF)	10/06/2001	15° 36' 50"S 47° 41' 30"W	25
Cipó-1	Serra do Cipó (MG)	21/06/2000	19° 17' 58"S 43° 36' 08"W	24
Cipó-2	Serra do Cipó (MG)	21/06/2000	19° 17' 29"S 43° 36' 06"W	47
Cipó-3	Serra do Cipó (MG)	19/06/2001	19° 17' 58"S 43° 36' 08"W	32
Cipó-9	Serra do Cipó (MG)	15/05/2002	19° 17' 28"S 43° 36' 06"W	27
Goiás-1	Pirenópolis (GO)	13/06/2001	15° 53' 30"S 48° 53' 19"W	32
Goiás-2	Anápolis (GO)	13/06/2001	16° 03' 49"S 48° 51' 15"W	34
Goiás-3	Anápolis (GO)	13/06/2001	16° 12' 05"S 48° 54' 39"W	34
Goiás-5	Anápolis (GO)	13/06/2001	16° 13' 14"S 48° 55' 20"W	31
Goiás-6	Anápolis (GO)	13/06/2001	16° 24' 27"S 48° 59' 08"W	41

Tratamento dos insetos

Os capítulos coletados foram colocados em potes plásticos com tampa telada. De cada coleta foi retirada uma exsicata que foi depositada no Herbário da Unicamp (UEC). Os adultos de *T. sp1* que emergiram foram alimentados com mel e água por 4 -5 dias e depois foram congelados em nitrogênio líquido.

De cada indivíduo estudado foi retirada uma das asas, que foi montada em lâmina com bálsamo do Canadá sintético. A genitália também foi dissecada e colocada individualmente em frascos tipo *eppendorf* contendo solução de glicerina - etanol (1:1). Essas estruturas podem ser úteis no esclarecimento de dúvidas quanto à identificação desses insetos.

Procedimentos de eletroforese

1) Extração

Os indivíduos inteiros foram macerados manualmente com um bastão de vidro em 30µl de solução de gel do "sistema a" (tabela 1).

2) Aplicação das amostras

Em cada macerado foram colocados 3 retângulos de 10 x 4 mm de papel Whatman #1, que foram aplicados em géis de amido Sigma 8,5%. As amostras aplicadas nas extremidades do gel foram marcados com azul de bromofenol a fim de indicar a posição de corrida. Os sistemas-tampão utilizados estão na tabela 2.

3) Coloração

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 utilizados e condições de corrida.

	Sistema a pH 8,6 / 50mA	Sistema b 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 foi feita.

Referência (EC)	Enzima (abreviação)	Sistema
4.2.1.3	Aconitase (ACO)	(b)
1.2.3.1	Oxidase aldeídica (AO)	(a)
1.1.1.44	Desidrogenase do 6-fosfogluconato (6-PGD)	(c)
1.1.1.49	Desidrogenase da glicose-6-fosfato-1 (G6PD)	(c)
1.1.1.30	Desidrogenase do 3-hidroxitbutirato (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 ou 3.4.13	Peptidases (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 as distâncias e identidades genéticas (Nei 1972, 1978) foram calculadas no programa BIOSYS I (Swofford & Selander 1981).

A matriz de identidade genética foi usada para desenhar um dendrograma por UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) e um por *neighbor joining* (NJ) no programa Mega 2.1 (Kumar *et al.* 2000). Os estimadores da estatística F (θ e f – Weir & Cockerham 1984) e o teste de significância do f para verificar desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculados no programa Fstat (Goudet 2001). As

probabilidades foram corrigidas pelo número de testes feitos segundo Rice (1989 – correção de Bonferroni).

Para localizar desequilíbrios de ligação entre os locos foram criadas tabelas de contingência para todos os pares de locos em cada população. Foram então feitos testes de probabilidade para cada tabela usando a cadeia de Markov com 1000 replicações no programa Genepop (Raymond & Rousset 1995) e as probabilidades foram corrigidas pelo número de testes feitos segundo Rice (1989 – correção de Bonferroni).

RESULTADOS

Obteve-se boa resolução nos seguintes locos enzimáticos: Aco-1, Aco-2, Ao, Est, Fum, 6-Pgd, G6pd, Gdh, Hbdh, Idh, Mdh, Me, Pgm, Pep-1, Pep-2, Pgi-1 e Pgi-2. Os locos Aco-2, Pgi-2, Pep-1 e G6pd foram monomórficos para o morfo claro e Aco-2, Pep-1, Pep-2 e Est para o morfo escuro.

As freqüências alélicas dos locos com variabilidade estão apresentadas de duas formas: na tabela 4, os indivíduos estão agrupados por local de coleta, sendo consideradas quatro OTUs no Cipó, duas em Brasília e cinco em Goiás. Na tabela 5, estão apresentados somente os locos nos quais as freqüências alélicas diferiram quando cada morfo foi separado por local de coleta. Tem-se uma OTU clara no Cipó, duas claras em Brasília, cinco claras em Goiás e quatro escuras no Cipó. A outra OTU clara do Cipó (Cipó-2) apresentou apenas três indivíduos e foi excluída da análise.

Tabela 4: Distribuição das frequências alélicas nos 15 locais com variabilidade nas 11 OTUs organizadas por local de coleta.

Loco	Mobilidade relativa	Cipó-1	Cipó-2	Cipó-3	Cipó-9	Brasília-1	Brasília-2	Goiás-1	Goiás-2	Goiás-3	Goiás-5	Goiás-6
<u>Hbdh</u>												
N		12	25	21	14	30	11	9	24	20	26	34
	0,56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,015
	1,00	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,985
<u>Gdh</u>												
N		-	-	21	19	-	24	25	32	32	18	33
	0,92	-	-	-	-	-	0,021	-	-	0,031	-	-
	1,00	-	-	1	1	-	0,979	0,960	0,969	0,969	0,944	1
	1,10	-	-	-	-	-	-	0,040	0,031	-	0,028	-
	1,22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,028	-
<u>Aco-1</u>												
N		11	18	19	12	30	18	19	22	23	15	18
	0,92	-	-	-	-	-	-	-	-	0,022	0,033	0,028
	1,00	0,545	1	1	1	0,800	0,944	1	1	0,978	0,933	0,972
	1,07	0,455	-	-	-	0,200	0,056	-	-	-	0,033	-
<u>Idh</u>												
N		23	46	32	26	55	21	31	34	34	34	40
	0,88	0,065	0,011	0,281	0,038	0,009	-	-	-	0,044	0,059	0,013
	0,94	0,065	0,185	0,219	0,038	0,027	-	-	0,015	0,015	-	0,013
	1,00	0,870	0,804	0,438	0,885	0,964	0,976	1	0,971	0,926	0,941	0,963
	1,06	-	-	0,063	0,038	-	0,024	-	0,015	0,015	-	0,013
<u>Fum</u>												
N		24	35	32	27	42	25	32	33	34	34	42
	0,6	0,021	-	-	-	0,012	0,040	-	-	-	-	0,012
	0,77	-	-	-	-	-	-	0,047	0,061	0,059	-	-
	1,00	0,896	1	0,969	1	0,964	0,960	0,922	0,939	0,941	1	0,988
	1,09	0,083	-	-	-	0,024	-	-	-	-	-	-
	1,19	-	-	0,031	-	-	-	0,031	-	-	-	-

Continuação da tabela 4.

Loco	Mobildade relativa	Cipó-1	Cipó-2	Cipó-3	Cipó-9	Brasília-1	Brasília-2	Goiás-1	Goiás-2	Goiás-3	Goiás-5	Goiás-6
<u>Ao</u>												
N		-	-	18	26	-	25	32	32	29	31	42
	0,9	-	-	-	-	-	-	0,094	0,031	0,034	0,016	-
	1,00	-	-	1	1	-	0,700	0,828	0,906	0,862	0,855	0,917
	1,1	-	-	-	-	-	0,300	0,078	0,063	0,103	0,129	0,083
<u>Me</u>												
N		20	35	32	27	43	25	32	34	34	34	42
	0,78	0,200	0,314	0,500	0,519	-	-	-	0,029	-	-	-
	0,9	0,350	0,543	0,500	0,481	0,140	-	-	-	-	0,029	-
	1,00	0,300	0,143	-	-	0,814	0,960	1	0,941	0,912	0,971	1
	1,05	0,150	-	-	-	0,047	0,040	-	0,029	0,088	-	-
<u>Pgi-1</u>												
N		24	47	32	27	54	25	31	34	34	31	41
	0,33	-	-	-	-	-	0,040	0,065	-	-	-	0,024
	1,00	0,667	0,106	0,016	0,037	0,954	0,960	0,935	1	1	1	0,976
	3,9	0,333	0,894	0,984	0,963	0,046	-	-	-	-	-	-
<u>Pgi-2</u>												
N		24	47	32	27	55	25	32	34	34	31	41
	1,00	1	0,979	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2,00	-	0,021	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Pep-2</u>												
N		10	28	32	27	23	25	32	34	34	34	42
	1,00	1	1	1	1	1	0,960	1	1	1	1	1
	1,13	-	-	-	-	-	0,040	-	-	-	-	-
<u>Mdh</u>												
N		21	41	30	26	45	24	30	34	32	34	40
	0,75	0,190	0,707	0,667	1	0,067	0,021	0,017	-	-	-	-
	0,82	0,143	0,220	0,333	-	-	-	-	-	0,016	0,029	-
	1,00	0,667	0,073	-	-	0,933	0,979	0,917	1	0,984	0,971	0,975
	1,15	-	-	-	-	-	-	0,067	-	-	-	0,025

Continuação da tabela 4.

Loco	Mobilidade relativa	Cipó-1	Cipó-2	Cipó-3	Cipó-9	Brasília-1	Brasília-2	Goiás-1	Goiás-2	Goiás-3	Goiás-5	Goiás-6
<u>Gópd</u>												
N		6	28	21	17	31	25	21	28	30	23	36
	0,84	0,333	0,821	1	0,941	-	-	-	-	-	-	-
	1,00	0,667	0,179	-	0,059	1	1	1	1	1	1	1
<u>Pgm</u>												
N		20	47	31	24	52	20	22	22	28	29	30
	0,63	-	-	-	-	0,029	0,075	0,023	-	-	-	0,017
	0,77	0,125	0,043	-	0,021	0,163	0,225	0,341	0,182	0,143	0,103	0,067
	0,87	0,050	0,096	-	-	0,250	-	0,136	0,273	0,214	0,172	0,033
	1,00	0,700	0,606	0,387	0,646	0,442	0,375	0,318	0,409	0,464	0,517	0,567
	1,16	0,125	0,255	0,581	0,333	0,096	0,300	0,182	0,114	0,143	0,190	0,267
	1,37	-	-	0,032	-	0,019	0,025	-	-	0,036	0,017	0,050
	0,5	-	-	-	-	-	-	-	0,023	-	-	-
<u>Est</u>												
N		24	35	23	27	40	25	23	24	26	26	34
	1,00	1	1	1	1	1	0,960	1	1	1	1	1
	1,05	-	-	-	-	-	0,040	-	-	-	-	-
<u>Ópgd</u>												
N		8	15	10	19	24	10	16	17	22	15	12
	0,71	-	0,133	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,86	0,125	0,467	-	-	0,208	-	-	-	-	-	-
	0,9	-	0,067	-	-	0,042	-	-	-	-	-	-
	1,00	0,500	0,333	1	1	0,625	1	1	1	1	1	1
	1,14	0,375	-	-	-	0,125	-	-	-	-	-	-

Tabela 5: Distribuição das frequências alélicas, nas 12 OTUs, dos 4 locos que separavam os morfos claro e escuro de *T. spl.*

Loco	Mobilidade relativa	Claro											
		Escuro						Claro					
		Cipó-1	Cipó-2	Cipó-3	Cipó-9	Brasília-1	Cipó-1	Brasília-2	Goiás-1	Goiás-2	Goiás-3	Goiás-5	Goiás-6
<u>Me</u>													
N		6	33	32	27	43	14	25	32	34	34	34	42
	0,78	0,500	0,333	0,500	0,519	-	0,071	-	-	0,029	-	-	-
	0,9	0,500	0,576	0,500	0,481	0,140	0,286	-	-	-	-	0,290	-
	1,00	-	0,091	-	-	0,814	0,429	0,960	1	0,941	0,912	0,971	1
	1,05	-	-	-	-	0,047	0,214	0,040	-	0,029	0,088	-	-
<u>Pgi-1</u>													
N		8	44	32	27	54	16	25	32	34	34	31	41
	0,33	-	-	-	-	-	-	0,040	0,063	-	-	-	0,024
	1,00	-	0,057	0,016	0,037	0,954	1	0,960	0,938	1	1	1	0,976
	3,9	1	0,943	0,984	0,963	0,046	-	-	-	-	-	-	-
<u>Mdh</u>													
N		7	38	30	26	45	14	24	30	34	32	34	40
	0,75	0,571	0,763	0,667	1	0,067	-	0,021	0,017	-	-	-	-
	0,82	0,429	0,257	0,333	-	-	-	-	-	-	0,016	0,029	-
	1,00	-	-	-	-	0,933	1	0,979	0,917	1	0,984	0,971	0,975
	1,15	-	-	-	-	-	-	-	0,067	-	-	-	0,025
<u>G6pd</u>													
N		2	26	21	17	31	4	25	21	28	30	23	36
	0,84	1	0,885	1	0,941	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,00	-	0,115	-	0,059	1	1	1	1	1	1	1	1

Quatro locos (Pgi-1, Me, Mdh e G6pd) claramente separavam os morfos claro e escuro (figuras 1, 2, 3 e 4). Segundo Ayala (1983), um loco é considerado diagnóstico se qualquer indivíduo puder, baseando-se no genótipo deste loco, ser dito de um ou outro *pool* gênico com uma certeza de 99 ou 99,9%. Seguindo esta definição, nenhum destes locos pode ser considerado diagnóstico apesar do alelo mais freqüente em cada morfo ser sempre o mesmo, mas diferente entre eles.

No agrupamento por local de coleta, a população Cipó-1 apresentava mais indivíduos claros no total que a Cipó-2. Na tabela 4 vê-se que, apesar dos morfos estarem juntos nas OTUs, nos locos Pgi-1, Mdh o alelo mais freqüente em Cipó-1 (Pgi-1^{1,00}, Mdh^{1,00}) foi o mesmo de Brasília-1, Brasília-2, Goiás-1, Goiás-2, Goiás-3, Goiás-5 e Goiás-6 e diferente de Cipó-2, Cipó-3 e Cipó-9 (Pgi-1^{3,9}, Mdh^{0,75}).

No agrupamento por coloração e local de coleta, os alelos mais freqüentes em Cipó-1 clara, Brasília-1, Brasília-2, Goiás-1, Goiás-2, Goiás-3, Goiás-5 e Goiás-6 nos locos Pgi-1, Me, Mdh e G6pd (Pgi-1^{1,00}, Mdh^{1,00}, Me^{1,00}, G6pd^{1,00}) foram diferentes dos mais freqüentes em Cipó-1 escura, Cipó-2, Cipó-3 e Cipó-9 (Pgi-1^{3,9}, Mdh^{0,75}, Me^{0,9} e Me^{0,78}, G6pd^{0,84}) (figuras 1, 2, 3 e 4).

Detectou-se desequilíbrio de ligação entre os locos Pgi-1-Pgm em Cipó-1, Me-Mdh e Me-G6pd em Cipó-2 e Idh-Mdh em Cipó-3, no agrupamento por local de coleta. No agrupamento por coloração e local de coleta somente os locos Me-Mdh em Cipó-2 e Idh-Mdh em Cipó-3 apresentavam desequilíbrio de ligação.

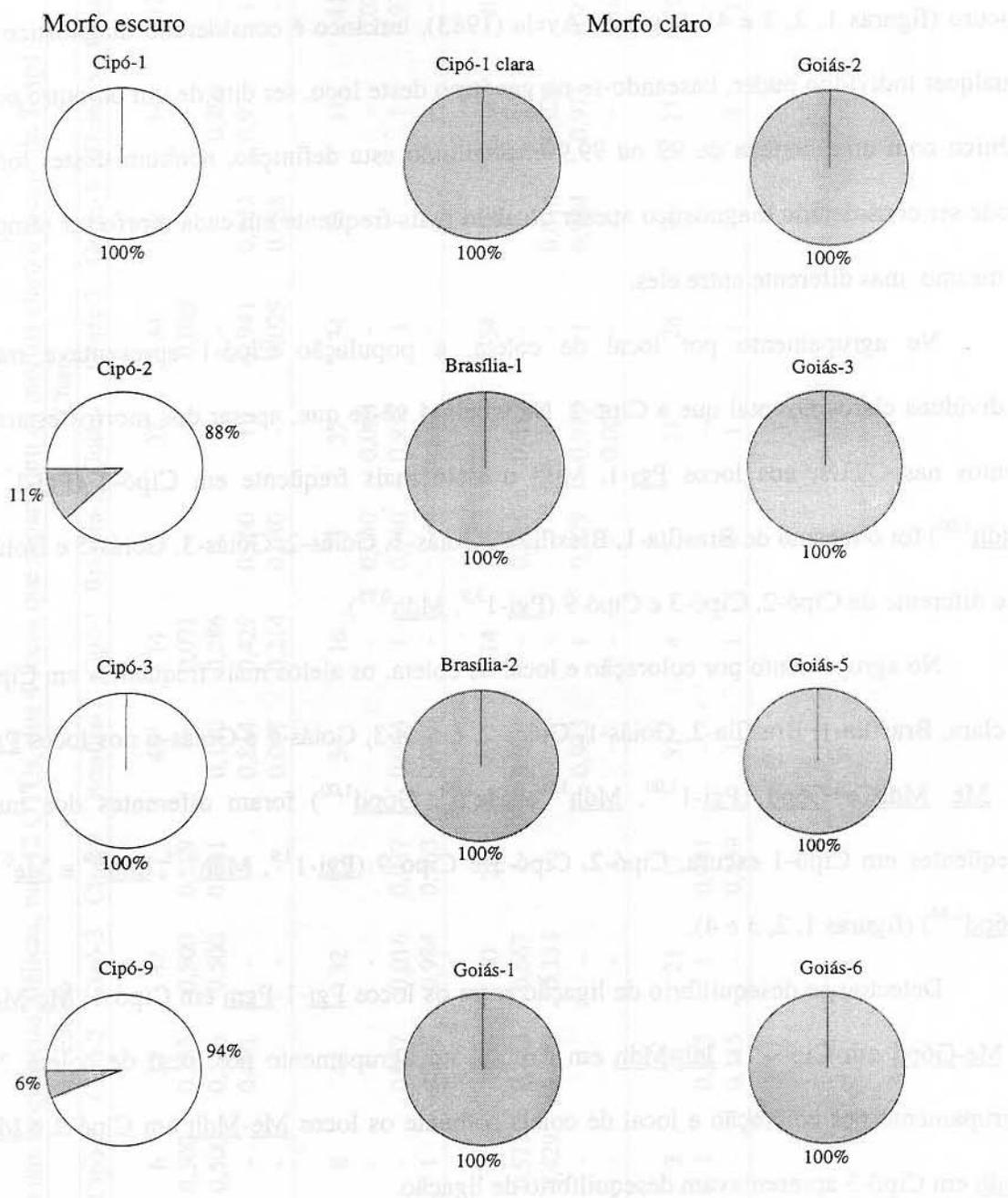


Figura 1: Distribuição das frequências alélicas no loco $G6pd$ nas populações agrupadas por coloração e local de coleta. Em branco o alelo $G6pd^{0,84}$ e em cinza o alelo $G6pd^{1,00}$. Na primeira coluna, estão as populações do morfo escuro e nas outras duas, as do morfo claro.

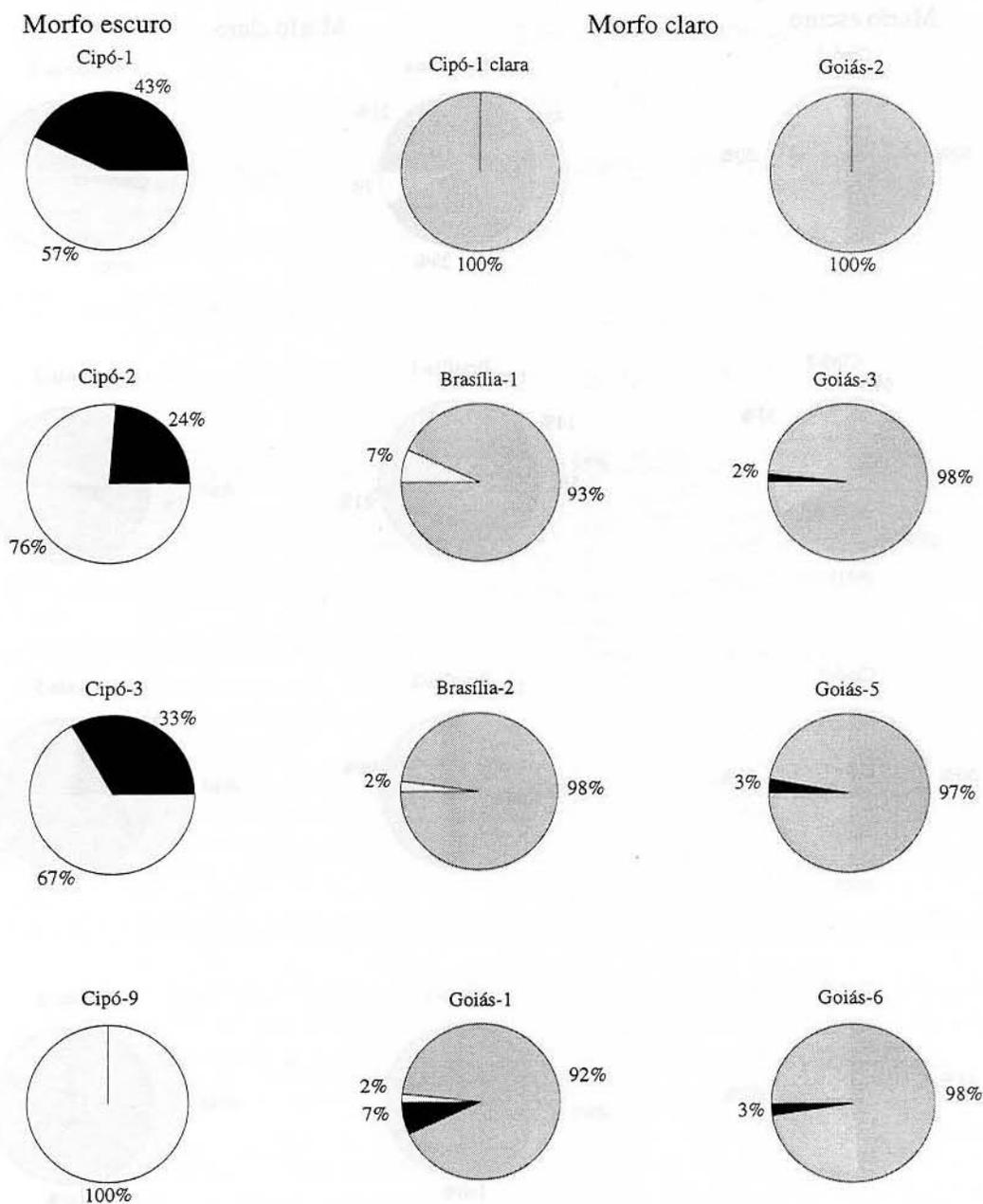


Figura 2: Distribuição das freqüências alélicas no loco Mdh nas populações agrupadas por coloração e local de coleta. Em preto o alelo Mdh^{0,75}, em branco Mdh^{0,82}, em cinza claro Mdh^{1,00} e em cinza escuro Mdh^{1,15}. Na primeira coluna, estão as populações do morfo escuro e nas outras duas, as do morfo claro.

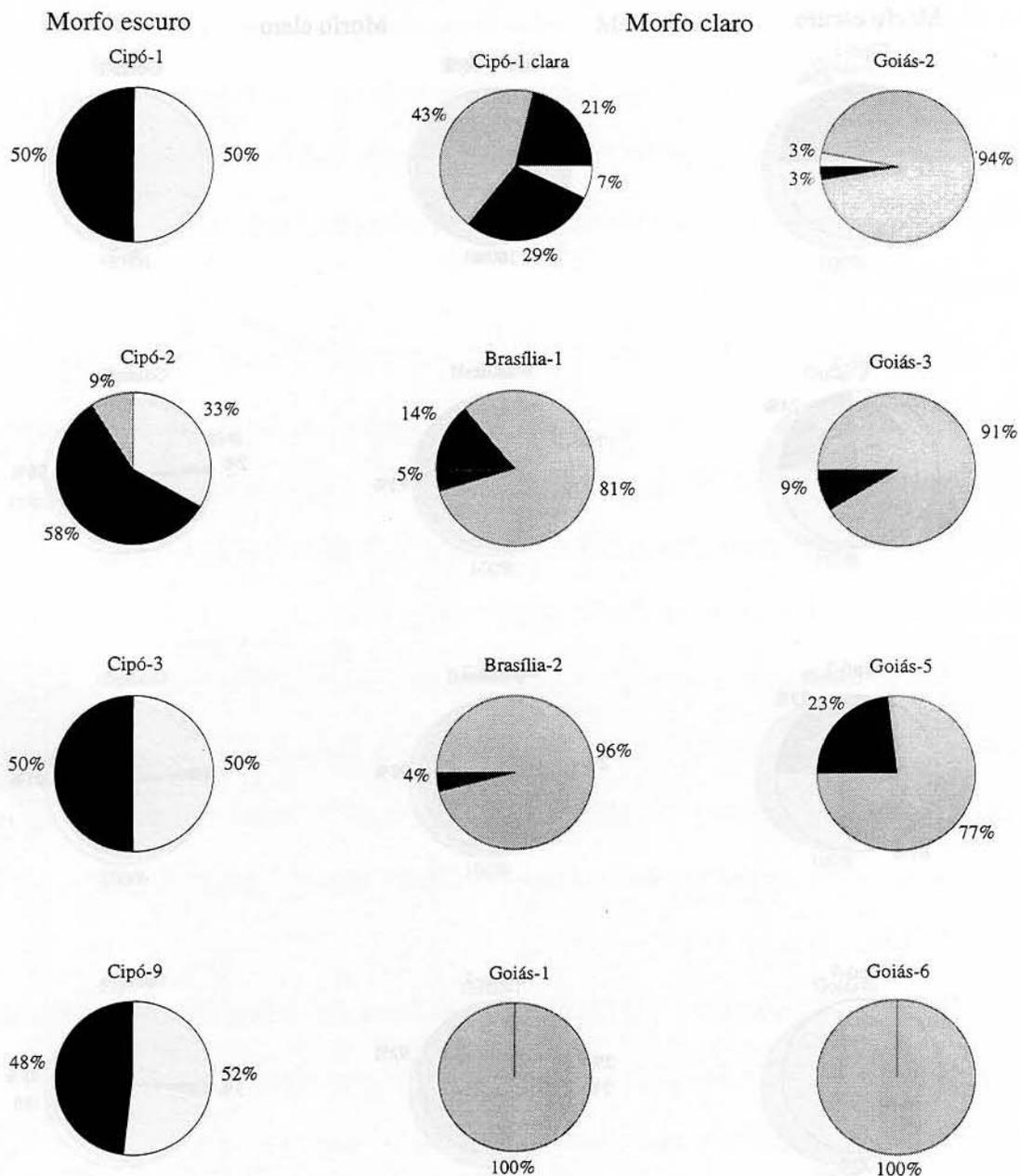


Figura 3: Distribuição das frequências alélicas no loco Me nas populações agrupadas por coloração e local de coleta. Em branco o alelo $Me^{0,78}$, em preto $Me^{0,9}$, em cinza claro $Me^{1,0}$ e em cinza escuro $Me^{1,05}$. Na primeira coluna, estão as populações do morfo escuro e nas outras duas, as do morfo claro.

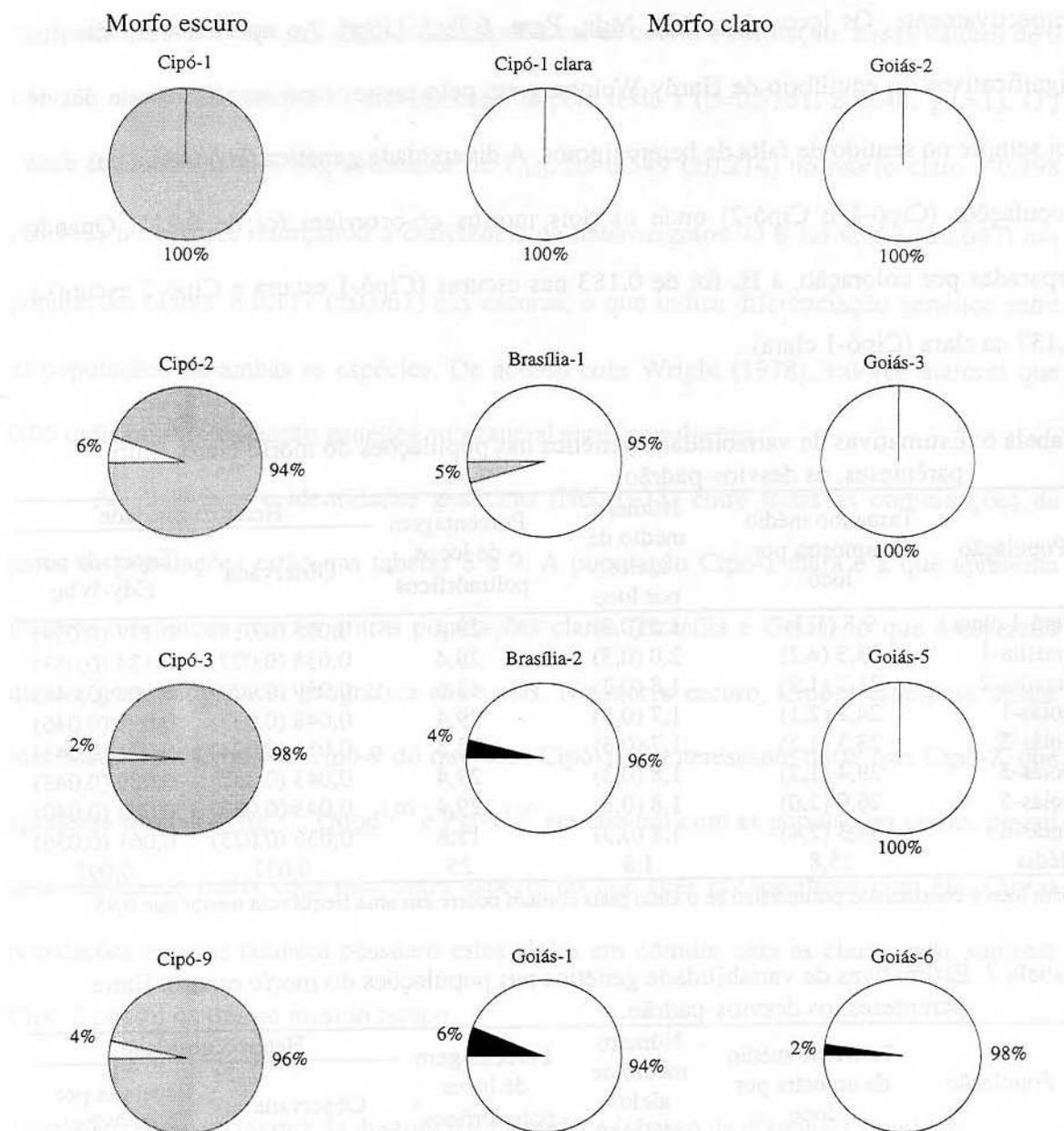


Figura 4: Distribuição das freqüências alélicas no loco P_{gi-1} nas populações agrupadas por coloração e local de coleta. Em preto o alelo $P_{gi-1}^{0,33}$, em branco $P_{gi-1}^{1,0}$ e em cinza claro $P_{gi-1}^{3,9}$. Na primeira coluna, estão as populações do morfo escuro e nas outras duas, as do morfo claro.

As tabelas 6 e 7 resumem a variabilidade genética nos morfos claro e escuro, respectivamente. Os locos Aco, Me, Mdh, Pgm, 6-Pgd, G6pd, Ao apresentaram desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg em pelo menos uma amostra e este desvio foi sempre no sentido de falta de heterozigotos. A diversidade genética (H_e) média nas duas populações (Cipó-1 e Cipó-2) onde os dois morfos co-ocorriam foi de 0,217. Quando separadas por coloração, a H_e foi de 0,183 nas escuras (Cipó-1 escura e Cipó-2 escura) e 0,137 na clara (Cipó-1 clara).

Tabela 6: Estimativas de variabilidade genética nas populações do morfo claro. Entre parênteses, os desvios-padrão.

População	Tamanho médio da amostra por loco	Número médio de alelos por loco	Porcentagem de locos polimórficos *	Heterozigosidade	
				Observada	Esperada por Hdy-Wbg
Cipó-1 clara	9,8 (1,3)	1,5 (0,2)	29,4	0,015 (0,015)	0,137 (0,059)
Brasília-1	33,3 (4,2)	2,0 (0,3)	29,4	0,038 (0,027)	0,134 (0,053)
Brasília-2	21,2 (1,3)	1,8 (0,2)	17,6	0,039 (0,029)	0,105 (0,046)
Goiás-1	24,2 (2,1)	1,7 (0,3)	29,4	0,048 (0,037)	0,092 (0,046)
Goiás-2	28,3 (1,5)	1,7 (0,3)	23,5	0,031 (0,024)	0,074 (0,043)
Goiás-3	29,4 (1,2)	1,8 (0,3)	29,4	0,043 (0,032)	0,089 (0,043)
Goiás-5	26,0 (2,0)	1,8 (0,3)	29,4	0,045 (0,033)	0,082 (0,040)
Goiás-6	34,3 (2,4)	1,8 (0,3)	11,8	0,036 (0,025)	0,061 (0,036)
Média	25,8	1,8	25	0,037	0,097

* Um loco é considerado polimórfico se o alelo mais comum ocorre em uma frequência menor que 0,95.

Tabela 7: Estimativas de variabilidade genética nas populações do morfo escuro. Entre parênteses, os desvios-padrão.

População	Tamanho médio da amostra por loco	Número médio de alelos por loco	Porcentagem de locos polimórficos *	Heterozigosidade	
				Observada	Esperada por Hdy-Wbg
Cipó-1 escura	4,6 (0,7)	1,5 (0,2)	41,2	0,037 (0,030)	0,197 (0,060)
Cipó-2	27,1 (3,4)	1,8 (0,3)	41,2	0,034 (0,016)	0,169 (0,058)
Cipó-3	24,4 (1,9)	1,5 (0,2)	23,5	0,024 (0,018)	0,133 (0,058)
Cipó-9	21,9 (1,5)	1,5 (0,2)	23,5	0,027 (0,015)	0,082 (0,040)
Média	19,5	1,6	32,3	0,030	0,145

* Um loco é considerado polimórfico se o alelo mais comum ocorre em uma frequência menor que 0,95.

O θ (Weir & Cockerham 1984), estimador de $F_{(ST)}$, foi 0,425 ($\pm 0,126$) no agrupamento por locais, e 0,462 ($\pm 0,139$) por local de coleta e coloração. Esses valores de θ não são significativamente diferentes entre si pelo teste z ($p=0,5361$; $z=0,48$; $g.l.=1$). O f (Weir & Cockerham 1984), estimador de $F_{(IS)}$, foi 0,549 ($\pm 0,214$) no morfo claro e 0,798 ($\pm 0,113$) no escuro, reforçando a deficiência de heterozigotos. O θ foi 0,069 ($\pm 0,047$) nas populações claras, e 0,117 ($\pm 0,061$) nas escuras, o que indica diferenciação genética entre as populações de ambas as espécies. De acordo com Wright (1978), valores maiores que 0,05 indicam diferenciação genética substancial entre populações.

As distâncias e identidades genéticas (Nei 1978) entre todas as combinações de pares de populações estão nas tabelas 8 e 9. A população Cipó-1 clara é a que apresenta maiores diferenças com as outras populações claras (Brasília e Goiás), o que é esperado dado a grande distância geográfica entre elas. No morfo escuro, Cipó-2 apresenta menor identidade com Cipó-3 e Cipó-9 do que com Cipó-1. É interessante notar que Cipó-2, que apresenta os alelos Me^{1,00}, G6pd^{1,00} e Pgi-1^{1,00} em comum com as populações claras, possui uma identidade maior com essa outra espécie do que suas coespecíficas com ela. Outras populações escuras também possuem estes alelos em comum com as claras, mas somente Cipó-2 possui os três ao mesmo tempo.

Tabela 8: Distância (acima da diagonal) e identidade (abaixo da diagonal) genéticas, segundo Nei (1978) no morfo escuro.

População	1	2	3	4
1.Cipó-1 escura	-	0,017	0,019	0,019
2.Cipó-2	0,983	-	0,034	0,025
3.Cipó-3	0,982	0,966	-	0,019
4.Cipó-9	0,981	0,975	0,981	-

Tabela 9: Distância (acima da diagonal) e identidade (abaixo da diagonal) genéticas segundo Nei (1978) no morfo claro.

População	1	2	3	4	5	6	7	8
1.Brasília-1	-	0,031	0,018	0,013	0,009	0,010	0,010	0,013
2.Cipó-1 clara	0,970	-	0,073	0,074	0,067	0,065	0,064	0,067
3.Brasília-2	0,983	0,930	-	0,003	0,006	0,004	0,003	0,004
4.Goiás-1	0,987	0,928	0,997	-	0,001	0,002	0,003	0,005
5.Goiás-2	0,991	0,936	0,994	0,999	-	0,000	0,001	0,003
6.Goiás-3	0,990	0,937	0,996	0,998	1,000	-	0,000	0,002
7.Goiás-5	0,990	0,938	0,997	0,997	0,999	1,000	-	0,000
8.Goiás-6	0,987	0,935	0,996	0,995	0,997	0,998	1,000	-

O agrupamento por coloração e local de coleta resultou em um dendrograma consistente (figura 5). Como a correlação cofenética (0,995) foi alta agrupando-se por UPGMA, a topologia se manteve quando usou-se *neighbor joining*. Ambas as distâncias de Nei (1972, 1978) geraram a mesma topologia.

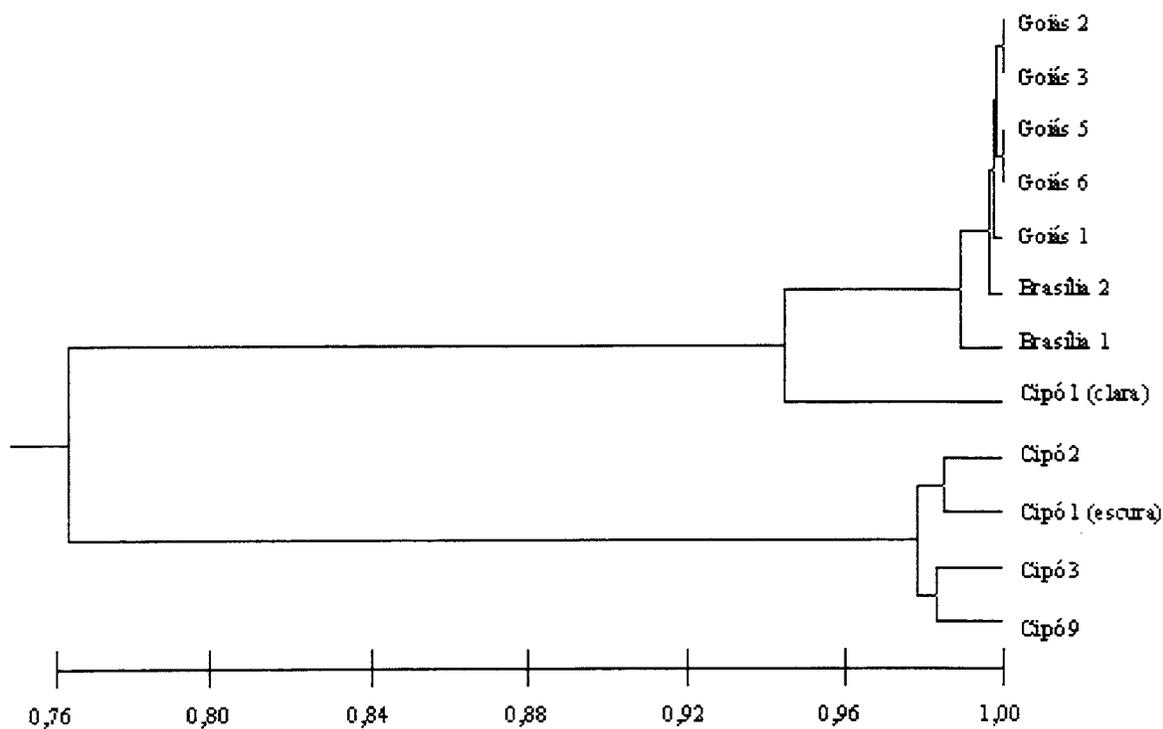


Figura 5: Dendrograma (UPGMA) de similaridade (Nei 1978) baseado em 17 locos de 12 amostras de *T. sp1*. (Correlação cofenética:0,995)

Uma análise morfológica mais detalhada foi feita posteriormente e ela detectou diferenças nas genitálias masculina e feminina dos dois morfos. (figura 6).

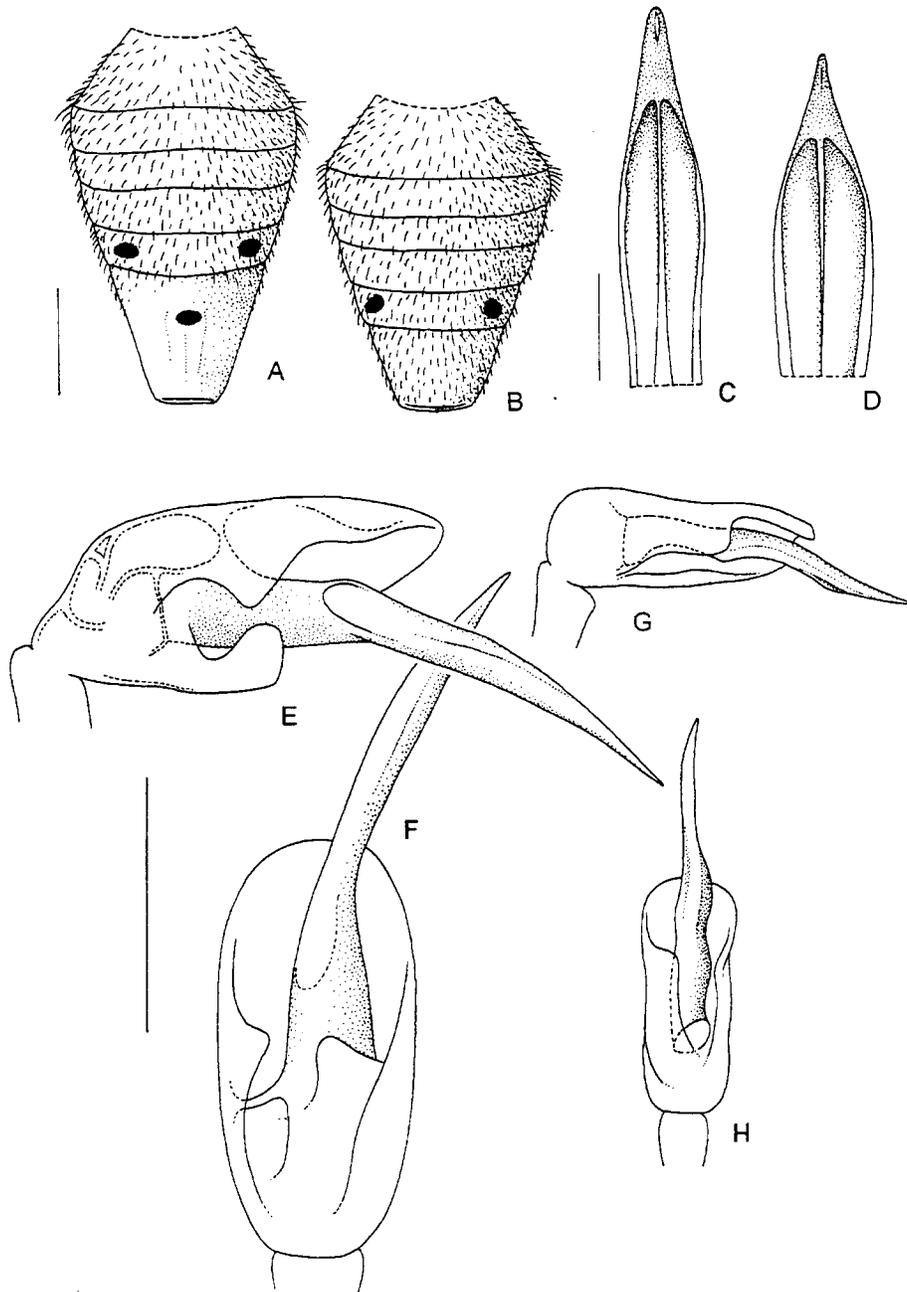


Figura 6 - Principais diferenças morfológicas entre os morfos claro e escuro de *T. sp1*: Abdômen das fêmeas, vista dorsal, barra = 0,5 mm: A – morfo claro, B – morfo escuro; Acúleos, vista ventral, barra = 0,1 mm: C – morfo claro, D – morfo escuro; *Distiphallus*, vista lateral (E,G) e inferior (F,H), barra = 0,2 mm: E, F – morfo claro; G, H – morfo escuro. Autoria: Eduardo Kickhölfen.

DISCUSSÃO

Deteccão de duas espécies crípticas em Tephritidae.

Amostras que contêm grupos distintos devem apresentar uma maior variabilidade intrapopulacional do que quando os grupos são considerados separadamente. Assim, a diminuição da diversidade genética quando separaram-se os organismos por coloração pode estar indicando que este último reflete grupos mais diferenciados geneticamente. Como somente duas amostras (Cipó-1 e Cipó-2) apresentavam os dois morfos juntos, comparou-se somente a diversidade destas populações.

O valor de θ encontrado entre as populações separadas por local de coleta foi 0,425 e, por coloração, 0,462. Esses valores são próximos ao do complexo de espécies crípticas *Anastrepha fraterculus* Wiedemann (0,428) (Steck 1991). *A. fraterculus* é tão variável morfologicamente que já foi descrita com nove nomes diferentes (Stone 1942, Zucchi 1981). Por outro lado, em duas espécies geneticamente distintas mas morfologicamente crípticas, *Rhagoletis pomonella* Walsh e *R. mendax* Curran, o θ entre populações simpátricas foi menor (0,311) (Feder *et al.* 1989). Os dois morfos de *T. sp1* seriam uma situação intermediária entre *Rhagoletis* e *Anastrepha*, já que possuem diferenças, mesmo que sutis, na coloração e diferenças genéticas.

Na análise de desequilíbrio de ligação, dos locos detectados quando agrupados por local de coleta (Pgi-1-Pgm em Cipó-1, Me-Mdh e Me-G6pd em Cipó-2 e Idh-Mdh em Cipó-3), somente Me-Mdh em Cipó-2 escura e Idh-Mdh em Cipó-3 permaneceram em desequilíbrio quando separados também por coloração. Em Cipó-1 e Cipó-2, havia os dois morfos juntos e esses locos em desequilíbrio apresentam alelos diferentes em maior

freqüência para cada morfo. Assim, esse desequilíbrio enfatiza a junção de grupos separados em uma mesma população.

A identidade encontrada entre os morfos (0,764) é menor que entre espécies morfológicamente distintas de *Anastrepha* e do que entre espécies crípticas de *Rhagoletis*. Entretanto, é maior que de espécies morfológicamente distintas de *Rhagoletis* e de *Tomoplagia* (0,66) (tabela 10).

Tabela 10: Comparação de identidade genética média entre populações e espécies de três gêneros de Tephritidae.

	<i>Rhagoletis</i> ^a	<i>Anastrepha</i> ^b	<i>Tomoplagia</i>
Espécies crípticas	0,936	0,838	0,764
Espécies morfológicamente distintas	0,726	0,856	0,660

^a Berlocher & Bush 1982

^b Morgante *et al.* 1980

Thorpe (1982), em uma revisão de níveis de divergência sistemática (vertebrados, invertebrados e plantas), concluiu que o valor crítico para valores de identidade genética de Nei (1972) entre espécies e populações de uma mesma espécie é de 0,85. Entre espécies, 97% dos valores de identidade estariam abaixo de 0,85 e entre populações, 98% dos valores estariam acima deste limite. Esse padrão foi verificado nas identidades entre populações dos dois morfos. Em Cipó-1, onde haviam mais indivíduos do morfo claro que do escuro, as identidades ficaram marginais entre essa população e as populações escuras (0,854 e 0,871). Já em Cipó-2, onde haviam poucos indivíduos claros, os valores entre esta população e todas as outras seguiram o padrão de populações escuras.

O agrupamento por coloração e local de coleta resultou em um dendrograma consistente com a hipótese de espécies crípticas e com alta correlação cofenética (0,995) (figura 5). Em uma filogenia do gênero *Tomoplagia* construída a partir do seqüenciamento dos genes mitocondriais COII e 16S, feita posteriormente, foram incluídos dois indivíduos

de cada morfo. Esse quatro indivíduos agruparam em um ramo consistente que, por sua vez, se dividiu em outros dois, contendo cada um deles indivíduos de apenas um dos morfos (Yotoko 2003). Além disso, as genitálias masculina e feminina dos morfos apresentam diferenças marcantes.

Sendo assim, há evidências de fontes diferentes que apóiam que os morfos claro e escuro de *T. sp1* pertencem a espécies distintas. Doravante, o morfo escuro será referido como *T. sp1* e o morfo claro como *T. sp2*.

Variabilidade genética em duas espécies crípticas de Tomoplagia.

Em Tephritidae, os níveis de variabilidade são bastante diferentes entre espécies e, em alguns casos, dentro delas (tabela 11). Segundo Malavasi & Morgante (1982), várias características biológicas e ecológicas de cada táxon podem ser responsáveis pela determinação de níveis particulares de heterozigosidade e polimorfismo.

O complexo de espécies crípticas *Rhagoletis pomonella*, possui vários membros. Alguns deles e suas heterozigosidades médias estão apresentados na tabela 11. Vê-se que, dentro deste complexo, a heterozigosidade esperada (H_e) varia de 0,115 a 0,40. Em *Ceratitis capitata*, a variabilidade depende da região amostrada. As populações na região de origem desta espécie (África) apresentam alta variabilidade. Já as populações introduzidas ao longo do mundo, têm uma variabilidade menor (Gasperi *et al.* 1991). Em populações espanholas de *Bactrocera oleae*, uma praga de oliveiras, a H_e é considerada alta, mesmo se comparada com outras espécies do gênero (Ochando & Reyes 2000).

O nível de variabilidade encontrado em *T. sp1* é alto (0,145) e próximo ao das populações de origem de *Ceratitis capitata* e de alguns membros do complexo *R. pomonella*. *T. sp2*, por outro lado, possui uma variabilidade menor (0,097) que *T. sp1*, superando apenas a das populações introduzidas de *C. capitata*.

Tabela 11: Variabilidade genética em espécies de Tephritidae.

Espécie	Subdivisão	Heterozigosidade esperada (H_e)
Complexo de espécies <i>Rhagoletis pomonella</i>	<i>R. mendax</i> ^a	0,115
	<i>R. zephyria</i> ^b	0,243
	<i>R. pomonella</i> ^b	0,400
	<i>sparkleberry fly</i> ^c	0,115
	<i>flowering dogwood fly</i> ^d	0,134
<i>Ceratitis capitata</i> ^e	África	0,144
	resto do mundo	0,067
<i>Bactrocera oleae</i> ^f	Espanha	0,107

^a Berlocher 1995

^b Feder *et al.* 1999

^c Payne & Berlocher 1995

^d Berlocher 1999

^e Gasperi *et al.* 1991

^f Ochoando & Reyes 2000

Como já visto, a variabilidade genética de *T. sp1* é um pouco maior que a de *T. sp2*. Isso pode indicar um gargalo genético recente em *T. sp2* que levou a uma perda de variabilidade. Esse gargalo pode ter sido causado por um evento fundador ou por uma redução populacional drástica. O efeito fundador poderia ter ocorrido recentemente com a migração de alguns indivíduos fundando novas populações e até ampliando a distribuição da espécie. Esse efeito também parece ser responsável pelo baixo nível de variabilidade nas populações de *C. capitata* introduzidas em todo mundo (Gasperi *et al.* 1991), que é próximo ao nível de *T. sp2*. Entretanto, há controvérsias em relação à diminuição da variabilidade devido a um evento fundador. Considerando-se apenas a população de *T. sp2* do Cipó, vê-se que ela apresenta a menor heterozigosidade entre as populações desta espécie. Além disso, apesar de quatro anos de coleta nesta localidade, obtiveram-se indivíduos desta espécie somente em um dos anos (2000). Assim, ao invés de um único evento fundador no Cipó, poderiam ocorrer inserções de *T. sp2* neste local anualmente e, por algum motivo, as populações não conseguiriam se estabelecer.

A outra possibilidade para a baixa variabilidade, redução populacional drástica, provavelmente ocorre todos os anos em *Tomoplagia*. As populações destas moscas

dependem dos capítulos de Asteraceae para sobrevivência e as floradas ocorrem de março a outubro (MacLeish 1987). Assim, há uma contração populacional seguida de uma expansão na florada seguinte. Uma redução seguida de uma expansão pouco tempo depois geralmente não provoca grandes mudanças na variabilidade genética de uma espécie. Além disso, *T. sp1* também sofre estas reduções populacionais todos os anos e apresenta uma variabilidade maior que *T. sp2*. Logo, não é possível estabelecer que fatores estão gerando a baixa variabilidade desta espécie. Outros estudos poderão esclarecer que processos estão causando essa baixa variabilidade.

As duas espécies são estruturadas geneticamente, o que é indicado pelos altos valores de θ . Em *T. sp1*, esta estruturação é maior apesar da pequena distância entre os quatro pontos (0,9 km). Além disso, Cipó-1 e Cipó-3, e Cipó-2 e Cipó-9 são apenas dois pontos geográficos amostrados em anos diferentes. Em *T. sp2* a distância pode chegar a 663 Km e apesar disso, a estruturação é bem menor. Esse nível diferente de estruturação pode ser resultado de um menor fluxo gênico entre as populações do Cipó (*T. sp1*) devido a barreiras físicas como vegetação mais densa e relevo acidentado.

Na faixa em que *Eremanthus* ocorre na Serra do Cipó, há uma transição entre as fisionomias campo rupestre e cerrado. No cerrado, as árvores são espaçadas, menores, mais retorcidas e a vegetação baixa torna-se ricamente dotada de gramíneas e subarbustos campestres. O campo limpo (rupestre) corresponde à vegetação baixa, sem árvores ou com raras arvoretas, muito afastadas entre si. No Centro-Oeste (Brasília e Goiás), há uma forte influência do campo limpo na constituição da vegetação do cerrado devido à grande identidade climática entre chapadas elevadas e os planaltos paulista e goiano. Em Goiás e São Paulo, a ocorrência da vegetação campestre é muito grande no planalto, ao passo que

em Minas (e Bahia) ela ocupa preferencialmente as serras, por ser o planalto mais baixo (Rizzini 1997). A vegetação do cerrado do Centro-Oeste é, assim, bem mais espaçada do que o esperado devido a essa influência campestre. Essa maior distância entre as plantas hospedeiras no Centro-Oeste também poderia restringir o fluxo gênico mas o relevo plano seria uma barreira a menos em comparação com a Serra do Cipó.

Essas barreiras físicas também podem estar gerando a deficiência de heterozigotos indicada pelos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg e pelos altos e positivos valores de f . Elas poderiam estar isolando as populações e, assim, aumentando a taxa de endocruzamento em ambas as espécies. O maior isolamento em *T. sp1* também é visto no maior valor de f e por um maior número de locos em desequilíbrio de Hardy-Weinberg.

Dos quatro locos que apresentaram o alelo mais freqüente diferente entre as espécies, uma população de *T. sp1* (Cipó-2) possuía alelos de *T. sp2* em três deles. No loco Gópd somente esta população e Cipó-9 (*T. sp1*) não apresentavam um alelo fixado, sendo que Cipó-9 é o mesmo ponto de coleta de Cipó-2, dois anos depois. Esse compartilhamento de alelos em locos em que o mais freqüente difere entre as espécies pode ser um indício de fluxo gênico (aparentemente raro) interespecífico. Entretanto, devido ao pequeno número de populações de *T. sp1*, nada conclusivo pode ser dito. É interessante notar que a população Cipó-1, que também possuía as duas espécies não apresentou esse compartilhamento de alelos. Como os alelos compartilhados por Cipó-2 estavam presentes não somente em heterozigose mas também em homozigose, se houve hibridação foi em alguma geração anterior.

Capítulo 2 - Relações entre duas espécies crípticas de Tephritidae inferidas por RFLP

INTRODUÇÃO

Espécies relacionadas que não adquirem diferenças morfológicas conspícuas durante o processo de especiação são denominadas crípticas (Mayr 1963). Em geral, elas são muito similares para serem separadas morfológicamente pela taxonomia tradicional mas apresentam diferenças comportamentais, fisiológicas ou outras que resultam em isolamento reprodutivo. Essas diferenças são normalmente em uma série de caracteres morfológicos menores, que só são percebidos em uma análise meticulosa (Mayr 1963).

Um número crescente de espécies crípticas vem sendo identificado na última década, principalmente com base em dados de isozimas, seqüenciamento ou uso de morfometria (Brierley *et al.* 1993, Henry 1994, Duffy 1996, Gomez & Snell 1996, Sanjuan *et al.* 1997, de Vargas *et al.* 1999, Dujardin & LePont 2000, Jousson *et al.* 2000, Knappentsbusch 2000, Norris & de Vargas 2000). Até o momento, espécies crípticas já foram descritas em fungos, esponjas, rotíferos, trematóides, peixes e insetos (Borchiellini *et al.* 2000, Henry 1994, Dujardin *et al.* 1996, Musyl & Keenan 1996, Serra *et al.* 1997, de Vargas *et al.* 1999, Dujardin & LePont 2000, Jousson *et al.* 2000, Shaw 2000). Essa taxa acelerada com que novos casos de espécies crípticas vêm sendo descritos sugere que as estimativas de riqueza global estão provavelmente subestimadas (Schonrögge *et al.* 2002).

Espécies crípticas são freqüentemente encontradas entre grupos de insetos fitófagos e parasitas (Mayr 1963). Como exemplo temos a família Tephritidae, onde a ocorrência de

espécies crípticas parece ser um fenômeno relativamente comum (White & Elson-Harris 1992).

No capítulo anterior, descrevemos a existência de duas espécies crípticas nesta família (*T. sp1* e *T. sp2*), no gênero *Tomoplagia*, através da eletroforese de isozimas: Elas ocorrem na subtribo Lychnophorinae (Asteraceae), ao contrário da maioria das outras espécies deste gênero, que parasitam a subtribo Vernoniinae (Prado *et al.* 2002).

T. sp1 ocorre principalmente na região da Serra do Cipó (MG), nas áreas de transição de vegetação campo rupestre-cerrado. *T. sp2* ocorre principalmente em Goiás e no Distrito Federal, com alguns indivíduos em áreas adjacentes de cerrado.

OBJETIVOS

- a) caracterizar e comparar a variabilidade genética de *T. sp1* e *T. sp2* nos locais amostrados para verificar se há algum padrão de variação geográfico ou temporal na distribuição de seus haplótipos.
- b) inferir eventos da história populacional de *T. sp1* e *T. sp2*.

MATERIAL E MÉTODOS

Pontos de coleta

As coletas foram realizadas nos anos de 1999 a 2002, nos municípios de Brasília (DF), Pirenópolis (GO), Anápolis (GO) e Santana do Riacho (MG) (tabela 1). Foram coletados capítulos de plantas dos gêneros *Eremanthus* e *Lychnophora*. Somente emergiram indivíduos em número suficiente de capítulos de espécies do gênero *Eremanthus*. Das

coletas de Goiás e Brasília, emergiram apenas indivíduos de *T. sp2* e das do Cipó, apenas de *T. sp1*.

Tabela 1: Localização das coleta e número de indivíduos utilizados na análise.

Nome	Local	Data de coleta	Coordenadas	Nº de indivíduos
Brasília-1	Brasília (DF)	08/08/1999	15° 36' 24"S 47° 34' 32"W	31
Brasília-2	Brasília (DF)	10/06/2001	15° 36' 50"S 47° 41' 30"W	30
Brasília-3	Brasília (DF)	09/06/2002	15° 40' 50"S 47° 52' 03"W	30
Brasília-4	Brasília (DF)	09/06/2002	15° 42' 17"S 47° 52' 38"W	24
Cipó-2	Serra do Cipó (MG)	21/06/2000	19° 17' 29"S 43° 36' 06"W	24
Cipó-3	Serra do Cipó (MG)	19/06/2001	19° 17' 58"S 43° 36' 08"W	30
Cipó-4	Serra do Cipó (MG)	19/06/2001	19° 17' 58"S 43° 36' 08"W	20
Cipó-5	Serra do Cipó (MG)	19/06/2001	19° 17' 51"S 43° 36' 09"W	20
Cipó-6	Serra do Cipó (MG)	19/06/2001	19° 17' 29"S 43° 36' 06"W	30
Cipó-7	Serra do Cipó (MG)	15/05/2002	19° 17' 56"S 43° 36' 09"W	21
Cipó-8	Serra do Cipó (MG)	15/05/2002	19° 17' 28"S 43° 36' 06"W	17
Cipó-9	Serra do Cipó (MG)	15/05/2002	19° 17' 28"S 43° 36' 06"W	28
Goiás-1	Pirenópolis (GO)	13/06/2001	15° 53' 30"S 48° 53' 19"W	29
Goiás-2	Anápolis (GO)	13/06/2001	16° 03' 49"S 48° 51' 15"W	30
Goiás-3	Anápolis (GO)	13/06/2001	16° 12' 05"S 48° 54' 39"W	29
Goiás-4	Anápolis (GO)	13/06/2001	16° 12' 05"S 48° 54' 39"W	30
Goiás-5	Anápolis (GO)	13/06/2001	16° 13' 14"S 48° 55' 20"W	30
Goiás-6	Anápolis (GO)	13/06/2001	16° 24' 27"S 48° 59' 08"W	30
Goiás-7	Anápolis (GO)	11/05/2002	16° 13' 16"S 48° 55' 22"W	25
Goiás-8	Anápolis (GO)	11/05/2002	16° 12' 06"S 48° 54' 40"W	30
Goiás-9	Anápolis (GO)	11/05/2002	16° 02' 38"S 48° 51' 07"W	20
Goiás-10	Pirenópolis (GO)	11/05/2002	15° 53' 36"S 48° 52' 52"W	30

Tratamento dos insetos

Os capítulos coletados foram colocados em frascos plásticos com tampa telada. De cada coleta foi feita uma exsicata que foi depositada no Herbário da Unicamp (UEC). Os adultos que emergiram foram alimentados com mel e água por 4 -5 dias e depois foram congelados em nitrogênio líquido.

Para registro do material analisado, de cada indivíduo estudado foi retirada uma das asas, que foi montada em lâmina com bálsamo do Canadá sintético. A genitália também foi dissecada e colocada individualmente em frascos tipo *ependorf* contendo solução de glicerina - etanol (1:1).

Análise de DNA mitocondrial

1) Extração de DNA total

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).

2) A escolha do gene

As regiões mais comumente seqüenciadas na sistemática molecular de insetos são mtDNA (DNA mitocondrial) e rDNA (DNA ribossômico) nuclear. Para o mtDNA, os genes mais seqüenciados são citocromo oxidase I e II (COI/II) e 16S rDNA. Destes, COII foi seqüenciado para a maior variedade de grupos, com seqüências homólogas disponíveis para quase todas as ordens de insetos. COI foi seqüenciada em tantos grupos quanto COII mas, devido ao seu comprimento, a região específica escolhida varia entre os estudos. Uma região do gene 16S correspondente a posições 12900-13400 de *Drosophila yakuba* (Clary & Wolstenhome 1987) também foi seqüenciada na maioria dos grupos com exceção de Lepidoptera (Caterino *et al.* 2000).

O seqüenciamento de fragmentos maiores (mais de 1kb) aumenta a probabilidade de regiões com diferentes níveis de variação sejam amostradas, dando resolução para uma amplitude maior de divergências (Caterino *et al.* 2000). Além disso, como o fragmento amplificado será digerido com enzimas de restrição, um fragmento maior possui maior

probabilidade de apresentar bandas visíveis quando fracionado. Assim, a região contígua dos genes COI/COII, com 2325pb, foi a escolhida. Essa região já foi utilizada em estudos inter e intrapopulacionais com sucesso (Caterino & Sperling 1999; Landry *et al.*1999; Sperling *et al.*1995, 1999).

3) Amplificação da região COI/COII

Os *primers* utilizados para a amplificação da região contígua de COI/COII foram 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). As condições de reação para a amplificação deste foram: 7,5µl do tampão da *Taq* DNA polimerase (10x), dNTP 0,2mM, 0,4 mM de cada *primer*, MgCl₂ 3,5mM, 3U de *Taq* DNA polimerase, 3µl de DNA e H₂O até um volume final de 75 µl. A *Taq* DNA polimerase utilizada foi a *Brazilian Taq* (Invitrogen®).

As amplificações foram realizadas de modo automatizado através de um sistema de variação cíclica e controle de temperatura programado: um ciclo de 4 minutos a 94°C; 35 ciclos de 94°C por 30 segundo, 58°C por 1 minuto e 71°C por 30 segundos e um ciclo final de 71°C por 4 minutos.

4) Análise do mtDNA com endonucleases de restrição

Os fragmentos de COI/COII amplificados foram seqüenciados para um indivíduo de cada espécie e as seqüências obtidas foram cortadas virtualmente no programa Webcutter 2,0 (Heiman 1997). As enzimas que apresentaram polimorfismo de interesse foram escolhidas.

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* (C/TNA), *EcoRV* (GAT/ATC), *HaeIII* (GG/CC), *PvuII* (CAG/CTG), *RsaI* (GT/AC) e *XbaI* (T/CTAGA).

As condições utilizadas na digestão enzimática foram as recomendadas pelo fabricante (Invitrogen®). 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.

5) Análise da divergência de seqüência do mtDNA entre populações

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. Com os perfis de digestão de cada enzima de restrição em cada indivíduo, há a possibilidade de analisá-los de acordo com os fragmentos obtidos ou com os sítios de restrição que deram origem aos fragmentos. A análise de sítios de restrição é preferível à análise de fragmentos devido ao fato dos dados de fragmentos não serem analiticamente independentes (Bermingham *et al.* 1996). Assim, construiu-se 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) (D_A) (Nei & Li 1979) e as árvores de haplótipos

(*minimum spanning networks*) foram calculados pelo programa Arlequin (Schneider *et al.* 2000). A diversidade de haplótipos é a probabilidade de dois haplótipos escolhidos ao acaso em uma amostra serem diferentes, o que equivale à heterozigosidade esperada para diplóides. π é equivalente à diversidade haplotípica no nível nucleotídico. As *minimum spanning networks* incluem todas as *minimum spanning trees* (Kruslal 1956; Prim 1957) que foram calculadas a partir das matrizes de distância par a par entre todos os pares de haplótipos, usando a modificação de um algoritmo descrito em Rohlf (1973).

Neste mesmo programa também foi feita a análise de variância molecular hierárquica (AMOVA), com 1000 replicações e o ϕ_{ST} foi calculado (Excoffier *et al.* 1992). A estrutura genética das populações foi investigada por uma análise da composição da variância. A AMOVA fraciona a variância total em componentes de covariância devido a diferenças intra-individuais, inter-individuais e/ou interpopulacionais. O ϕ_{ST} reflete a correlação de diversidade haplotípica em diferentes níveis de subdivisão hierárquica. Um dendrograma (*neighbor-joining* - NJ), usando D_A como uma medida de distância, foi construído com o auxílio do programa Mega 2.1 (Kumar *et al.* 2001).

RESULTADOS

A enzima *DdeI* apresentou 6 padrões de restrição; *HaeIII*, 3; *PvuII*, 2; *EcoRV*, 4; *XbaI*, 2 e *RsaI*, 2 (tabela 2). Dos 19 sítios de restrição resultantes, quatro estavam presentes em mais de um padrão. Os padrões de restrição b e c de *HaeIII*, os padrões a e b de *PvuII*, os padrões b e c de *EcoRV*, e os padrões a e b de *RsaI* compartilhavam sítios. A figura 1 retrata os padrões de restrição de cada enzima. A relação entre eles foi estabelecida seguindo o princípio de que a perda de um sítio é mais provável que seu ganho (Templeton 1983). Dos 15 sítios restantes, dois (do padrão a de *PvuII* e de *RsaI*) estavam presentes em todos os indivíduos e não eram filogeneticamente informativos (tabela 3).

Tabela 2: Padrões de restrição de cada enzima com os respectivos número de sítios e tamanho dos fragmentos.

Enzima	Padrão de restrição	Número de sítios de restrição	Tamanho dos fragmentos (pb)
<i>HaeIII</i>	<u>a</u>	0	2325
	<u>b</u>	1	2122-203
	<u>c</u>	2	1978-203-144
<i>PvuII</i>	<u>a</u>	1	1477-848
	<u>b</u>	2	1477-581-267
<i>DdeI</i>	<u>a</u>	0	2325
	<u>b</u>	1	2062-263
	<u>c</u>	1	1311-1014
	<u>d</u>	1	2012-313
	<u>e</u>	1	1856-469
	<u>f</u>	1	2205-120
<i>XbaI</i>	<u>a</u>	0	2325
	<u>b</u>	1	2218-107
<i>EcoRV</i>	<u>a</u>	0	2325
	<u>b</u>	1	1215-1110
	<u>c</u>	2	1110-1110-105
	<u>d</u>	1	1188-1137
<i>RsaI</i>	<u>a</u>	1	1304-1021
	<u>b</u>	2	1304-729-292

Tabela 3: Estado de cada sítio em cada enzima nos haplótipos.

Haplótipos	Dde b	Dde c	Dde d	Dde e	Dde f	Hae b	Hae c	Pvu a	Pvu b	Xba b	Eco b	Eco c	Eco d	Rsa a	Rsa b
A	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
B	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0
C	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
D	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0
E	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0
F	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
G	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0
H	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0
I	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0
J	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0
K	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0
L	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
M	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0
N	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
O	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
P	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Q	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0
R	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
S	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0
T	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1
U	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1
V	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0
W	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0
X	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0

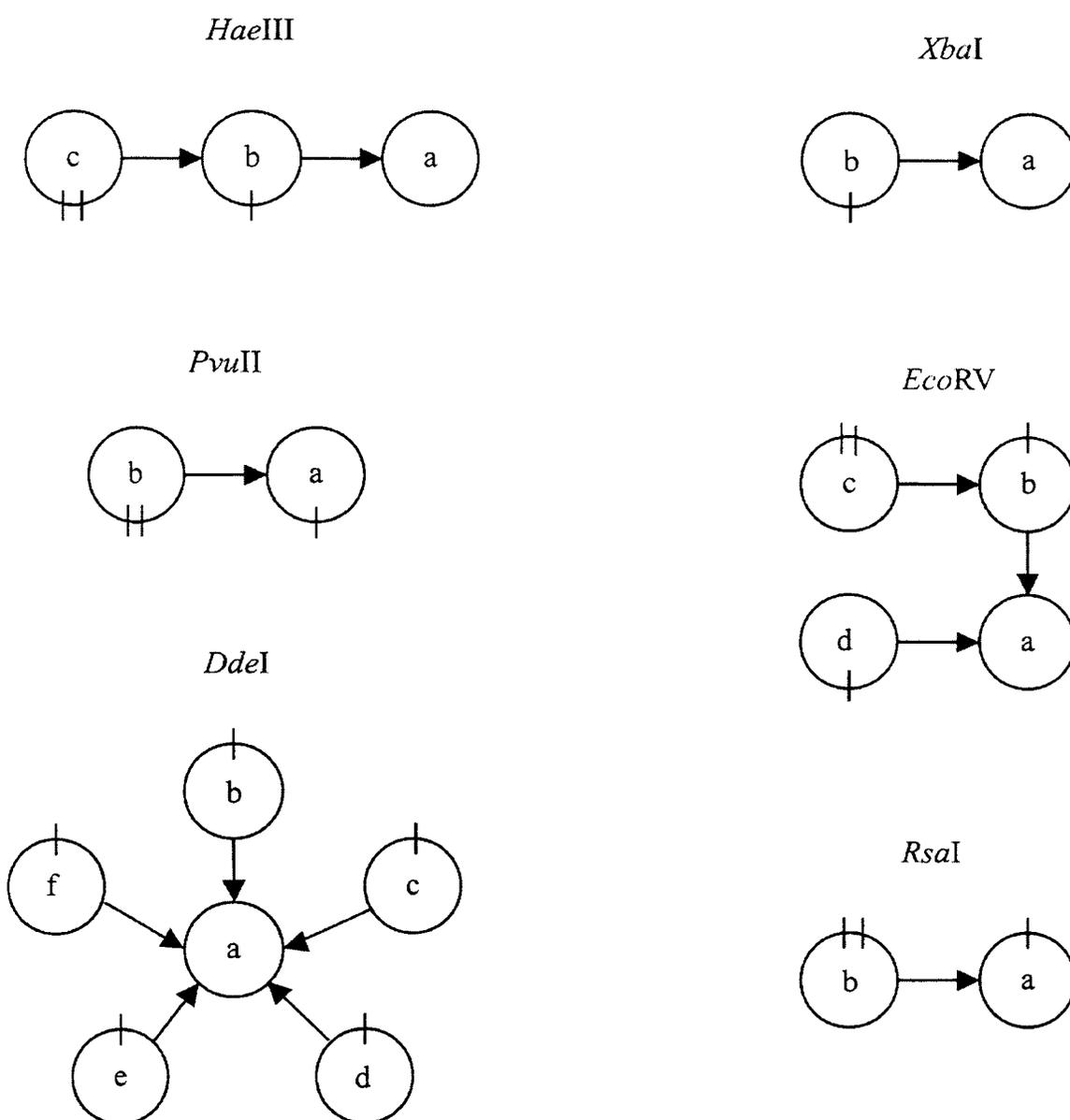


Figura 1: Padrões de restrição de cada enzima. Os traços indicam o número de sítios de restrição em cada padrão e as setas a provável relação entre eles.

A combinação dos 15 sítios de restrição resultou em 24 haplótipos denominados por letras maiúsculas (A-X). Destes 24 haplótipos, *T. sp2* possuía 15 e *T. sp1*, 11. As populações Brasília-1 e Cipó-3 possuíam o maior número de haplótipos, 8 e 7 respectivamente. Somente os haplótipos A e B estavam presentes nas duas espécies. O

haplótipo mais freqüente em todas as populações de *T. sp2* foi o A e, em *T. sp1*, o J, com exceção de Cipó-5, onde o Q foi o mais freqüente (tabelas 4 e 5).

Tabela 4: Freqüência dos haplótipos em *T. sp2*.

Haplótipos	Brasília-1	Brasília-2	Goiás-1	Goiás-2	Goiás-3	Goiás-4	Goiás-5
A	0,613	0,733	0,862	0,967	0,9	0,967	0,967
B	0,0323	-	-	-	-	-	-
C	0,0323	-	-	-	-	-	-
D	0,0645	-	0,0345	-	-	-	-
E	0,129	-	-	-	-	-	-
F	0,0323	-	-	0,0333	0,0667	-	-
G	0,0645	-	-	-	-	-	-
H	0,0323	-	-	-	-	-	-
K	-	0,0667	-	-	-	-	-
L	-	0,133	0,103	-	-	-	-
M	-	0,0333	-	-	-	-	-
N	-	0,0333	-	-	-	-	-
O	-	-	-	-	0,0333	0,0333	-
P	-	-	-	-	-	-	0,0333
X	-	-	-	-	-	-	-
Total	31	30	29	30	30	30	30

Continuação da tabela 4.

Haplótipos	Goiás-6	Goiás-7	Goiás-8	Goiás-9	Goiás-10	Brasília-3	Brasília-4
A	0,967	0,8	0,967	0,55	0,967	0,9	0,875
B	-	0,16	-	-	0,0333	-	0,0833
C	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	0,0333	-
G	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-	-
L	0,0333	-	0,0333	-	-	-	0,0417
M	-	-	-	0,45	-	-	-
N	-	-	-	-	-	-	-
O	-	-	-	-	-	-	-
P	-	-	-	-	-	0,0333	-
X	-	0,04	-	-	-	0,0333	-
Total	30	25	30	20	30	30	24

Tabela 5: Frequência dos haplótipos em *T. sp1*.

Haplótipos	Cipó-2	Cipó-3	Cipó-4	Cipó-5	Cipó-6	Cipó-7	Cipó-8	Cipó-9
A	0,375	-	0,05	0,0952	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	0,0952	-	0,0714
I	0,208	0,0667	-	-	0,133	0,19	0,0588	0,321
J	0,417	0,567	0,85	0,0952	0,7	0,714	0,941	0,607
Q	-	0,0333	0,1	0,762	-	-	-	-
R	-	0,0333	-	-	-	-	-	-
S	-	0,233	-	-	-	-	-	-
T	-	0,0333	-	-	-	-	-	-
U	-	0,0333	-	-	-	-	-	-
V	-	-	-	0,0476	-	-	-	-
W	-	-	-	-	0,167	-	-	-
Total	24	30	20	21	28	30	21	17

As estimativas de variabilidade estão apresentadas nas tabelas 6 e 7. Tanto a diversidade haplotípica quanto a nucleotídica variaram bastante entre as populações. Comparando as duas espécies, *T. sp1* apresenta uma maior variabilidade, com destaque para Cipó-2 que apresenta os maiores valores para todas as medidas. Em ambas as espécies, a maior parte da variação observada está dentro das populações; *T. sp1* apresenta maior estruturação (tabelas 8 e 9).

Tabela 6: Estimativas de variabilidade genética a partir de 15 sítios de restrição em *T. sp2*. Entre parênteses, os desvios-padrão.

População	Diversidade haplotípica (<i>h</i>)	Diversidade nucleotídica (π)
Brasília-1	0,615 (0,096)	0,102 (0,069)
Brasília-2	0,453 (0,104)	0,057 (0,046)
Brasília-3	0,193 (0,095)	0,012 (0,018)
Brasília-4	0,235 (0,109)	0,020 (0,024)
Goiás-1	0,254 (0,100)	0,033 (0,031)
Goiás-2	0,067 (0,061)	0,004 (0,009)
Goiás-3	0,191 (0,093)	0,012 (0,017)
Goiás-4	0,067 (0,061)	0,004 (0,010)
Goiás-5	0,067 (0,061)	0,004 (0,010)
Goiás-6	0,067 (0,061)	0,008 (0,014)
Goiás-7	0,347 (0,108)	0,022 (0,025)
Goiás-8	0,067 (0,061)	0,008 (0,014)
Goiás-9	0,521 (0,042)	0,032 (0,032)
Goiás-10	0,067 (0,061)	0,004 (0,010)
Média	0,229	0,023

Tabela 7: Estimativas de variabilidade genética a partir de 15 sítios de restrição em *T. sp1*.
Entre parênteses, os desvios-padrão.

População	Diversidade haplotípica (<i>h</i>)	Diversidade nucleotídica (π)
Cipó-2	0,670 (0,043)	0,122 (0,081)
Cipó-3	0,637 (0,081)	0,067 (0,051)
Cipó-4	0,279 (0,123)	0,033 (0,033)
Cipó-5	0,419 (0,127)	0,069 (0,053)
Cipó-6	0,480 (0,053)	0,070 (0,053)
Cipó-7	0,467 (0,112)	0,062 (0,050)
Cipó-8	0,118 (0,101)	0,015 (0,021)
Cipó-9	0,542 (0,070)	0,072 (0,054)
Média	0,451	0,064

Tabela 8: Análise de variância molecular (AMOVA) em *T. sp2*.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre populações	13	6,528	0,01376 V_b	11,07
Dentro das populações	385	42,529	0,11047 V_c	88,97
ϕ_{ST}	0,111			

Tabela 9: Análise de variância molecular (AMOVA) em *T. sp1*.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre populações	7	13,997	0,07415 V_b	23,70
Dentro das populações	183	43,678	0,23868 V_c	76,30
ϕ_{ST}	0,237			

As árvores dos haplótipos (*minimum spanning networks*) estão apresentadas nas figuras 2 e 3. Em *T. sp2*, os haplótipos estão com poucos intermediários entre eles e centralizados ao redor do mais freqüente, o que difere de *T. sp1*, onde eles estão mais distantes entre si e alguns intermediários estão ausentes

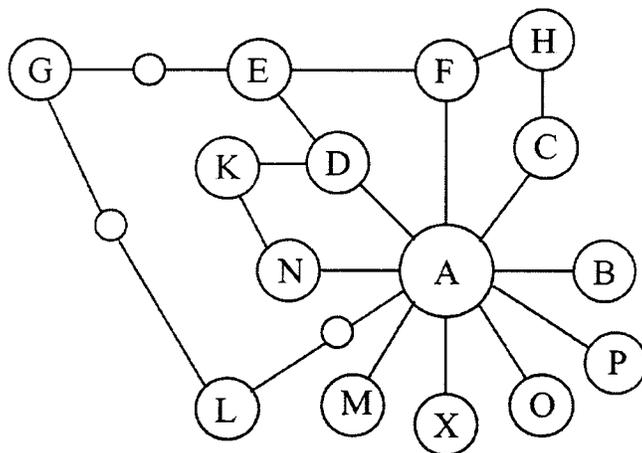


Figura 2: Árvore dos haplótipos (*minimum spanning networks*) de *T. sp2*.

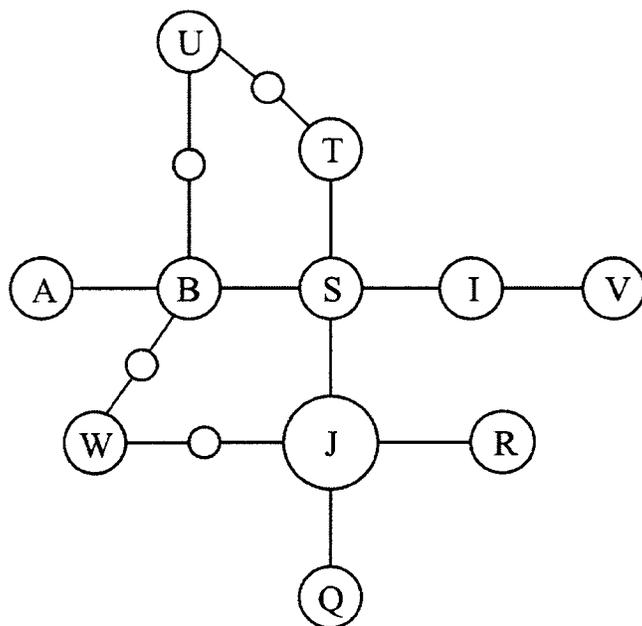


Figura 3: Árvore dos haplótipos (*minimum spanning networks*) de *T. sp1*.

O número de diferenças nucleotídicas entre as populações está apresentado na tabela 10. As diferenças foram maiores entre populações de *T. sp1* que de *T. sp2*. Segundo Nei (1987), os valores negativos em *T. sp2* indicam alta similaridade entre as populações. Cipó-2 é a população de *T. sp1* que apresenta a maior similaridade com as populações de *T. sp2*, sendo em alguns casos mais parecida com populações desta outra espécie (Brasília-1) do que com da sua própria (Cipó-5).

Na figura 4, temos um dendrograma usando o número de diferenças nucleotídicas como medida de distância e *neighbor-joining* como método de agrupamento. As populações Cipó-5 e Goiás-9 destacaram-se das outras, com ramos bem mais longos. Cipó-5 é a única população de *T. sp1* em que o haplótipo mais freqüente não é o J, e sim o Q. Goiás-9 apresenta o haplótipo M em freqüência próxima a do A, que nas outras populações de *T. sp2* está presente em uma freqüência alta, com os demais haplótipos em baixíssima freqüência. Um novo dendrograma foi feito retirando-se a população Cipó-2 da análise mas não ocorreram grandes alterações de topologia.

Tabela 10: Número médio de diferenças nucleotídicas entre as populações de *T. sp1* e *T. sp2* (D). Abaixo da diagonal, número corrigido (DA).

	Brasília-1	Cipó-2	Brasília-2	Goiás-1	Goiás-2	Goiás-3	Goiás-4	Goiás-5	Goiás-6	Cipó-3	Cipó-4
Brasília-1	-	2,821	1,430	1,213	1,016	1,065	1,033	1,033	1,058	3,727	3,806
Cipó-2	0,840	-	2,575	2,510	2,325	2,392	2,325	2,325	2,358	2,217	2,233
Brasília-2	0,123	0,912	-	0,745	0,567	0,633	0,567	0,567	0,582	3,624	3,990
Goiás-1	0,139	1,080	-0,010	-	0,309	0,376	0,309	0,309	0,329	3,648	4,0453
Goiás-2	0,170	1,123	0,040	0,015	-	0,129	0,067	0,067	0,10000	3,498	3,927
Goiás-3	0,155	1,125	0,041	0,017	-0,002	-	0,131	0,133	0,167	3,562	3,987
Goiás-4	0,187	1,123	0,039	0,014	0,000	0,0001	-	0,067	0,100	3,500	3,933
Goiás-5	0,187	1,123	0,039	0,014	0,000	0,002	0,000	-	0,100	3,500	3,933
Goiás-6	0,178	1,123	0,021	0,001	0,000	0,002	0,000	0,000	-	3,531	3,967
Cipó-3	2,171	0,306	2,388	2,645	2,722	2,722	2,724	2,724	2,722	-	1,217
Cipó-4	2,700	0,770	3,201	3,489	3,599	3,594	3,605	3,605	3,605	0,179	-
Cipó-5	2,559	1,146	3,360	3,630	3,679	3,628	3,733	3,733	3,733	0,667	0,481
Cipó-6	2,449	0,552	2,853	3,116	3,221	3,223	3,221	3,221	3,221	0,109	0,049
Goiás-7	0,197	0,943	0,059	0,035	0,020	0,022	0,020	0,020	0,020	2,424	3,321
Goiás-8	0,178	1,123	0,021	0,001	0,000	0,002	0,000	0,000	-0,004	2,722	3,605
Goiás-9	0,376	1,125	0,198	0,204	0,189	0,192	0,189	0,189	0,189	2,854	3,795
Goiás-10	0,185	1,081	0,039	0,015	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	2,667	3,542
Cipó-7	2,228	0,315	2,498	2,759	2,843	2,845	2,843	2,843	2,843	-0,017	0,115
Cipó-8	2,916	0,795	3,349	3,650	3,765	3,767	3,765	3,765	3,765	0,163	-0,006
Cipó-9	2,170	0,241	2,345	2,606	2,675	2,677	2,675	2,675	2,675	0,022	0,308
Brasília-3	0,170	1,123	0,039	0,015	-0,002	-0,002	0,000	-0,002	0,000	2,722	3,597
Brasília-4	0,174	1,023	0,020	0,001	0,004	0,006	0,004	0,004	-0,002	2,558	3,450

Continuação da tabela 10.

Cipó-5	Cipó-6	Goiás-7	Goiás-8	Goiás-9	Goiás-10	Cipó-7	Cipó-8	Cipó-9	Brasília-3	Brasília-4	Brasília-1	Brasília-2	Brasília-3	Brasília-4
4,020	3,907	1,190	1,058	1,450	1,031	3,722	3,905	3,773	1,083	1,150	Brasília-1	Cipó-2	1,083	1,150
2,962	2,367	2,292	2,358	2,554	2,283	2,165	2,140	2,199	2,392	2,354	Cipó-2	Cipó-2	2,392	2,354
4,501	3,993	0,733	0,582	0,953	0,567	3,673	4,020	3,628	0,633	0,678	Brasília-2	Brasília-2	0,633	0,678
4,538	4,023	0,476	0,329	0,726	0,309	3,701	4,087	3,656	0,376	0,425	Goiás-1	Goiás-1	0,376	0,425
4,360	3,900	0,233	0,100	0,4833	0,067	3,557	3,974	3,498	0,131	0,200	Goiás-2	Goiás-2	0,131	0,200
4,373	3,967	0,300	0,167	0,550	0,133	3,624	4,041	3,564	0,195	0,267	Goiás-3	Goiás-3	0,195	0,267
4,414	3,9000	0,233	0,100	0,483	0,067	3,557	3,9741	3,498	0,133	0,200	Goiás-4	Goiás-4	0,133	0,200
4,414	3,900	0,233	0,100	0,483	0,067	3,557	3,974	3,498	0,131	0,200	Goiás-5	Goiás-5	0,131	0,200
4,447	3,933	0,267	0,129	0,517	0,100	3,590	4,008	3,531	0,167	0,228	Goiás-6	Goiás-6	0,167	0,228
2,057	1,498	3,348	3,531	3,857	3,433	1,406	1,082	1,555	3,564	3,464	Cipó-3	Cipó-3	3,564	3,464
1,424	0,990	3,796	3,967	4,350	3,870	1,090	0,465	1,393	3,993	3,908	Cipó-4	Cipó-4	3,993	3,908
-	1,946	4,291	4,448	4,788	4,354	1,991	1,470	2,243	4,427	4,397	Cipó-5	Cipó-5	4,427	4,397
0,652	-	3,747	3,933	4,197	3,833	1,355	0,863	1,593	3,967	3,867	Cipó-6	Cipó-6	3,967	3,867
3,464	2,921	-	0,267	0,650	0,223	3,404	3,821	3,344	0,297	0,340	Goiás-7	Goiás-7	0,297	0,340
3,733	3,221	0,020	-	0,517	0,100	3,590	4,008	3,531	0,167	0,228	Goiás-8	Goiás-8	0,167	0,228
3,880	3,290	0,209	0,189	-	0,483	3,802	4,338	3,625	0,550	0,617	Goiás-9	Goiás-9	0,550	0,617
3,673	3,154	0,009	0,000	0,189	-	3,4908	3,908	3,431	0,133	0,194	Goiás-10	Goiás-10	0,133	0,194
0,662	0,029	2,543	2,843	2,861	2,7769	-	0,944	1,451	3,624	3,524	Cipó-7	Cipó-7	3,624	3,524
0,646	0,040	3,465	3,765	3,901	3,698	0,086	-	1,225	4,041	3,941	Cipó-8	Cipó-8	4,041	3,941
0,806	0,157	2,375	2,675	2,575	2,608	-0,020	0,259	-	3,564	3,464	Cipó-9	Cipó-9	3,564	3,464
3,679	3,221	0,017	0,000	0,189	0,000	2,843	3,765	2,675	-	0,267	Brasília-3	Brasília-3	-	0,267
3,586	3,058	-0,003	-0,002	0,193	-0,0023	2,680	3,602	2,511	0,004	-	Brasília-4	Brasília-4	0,004	-

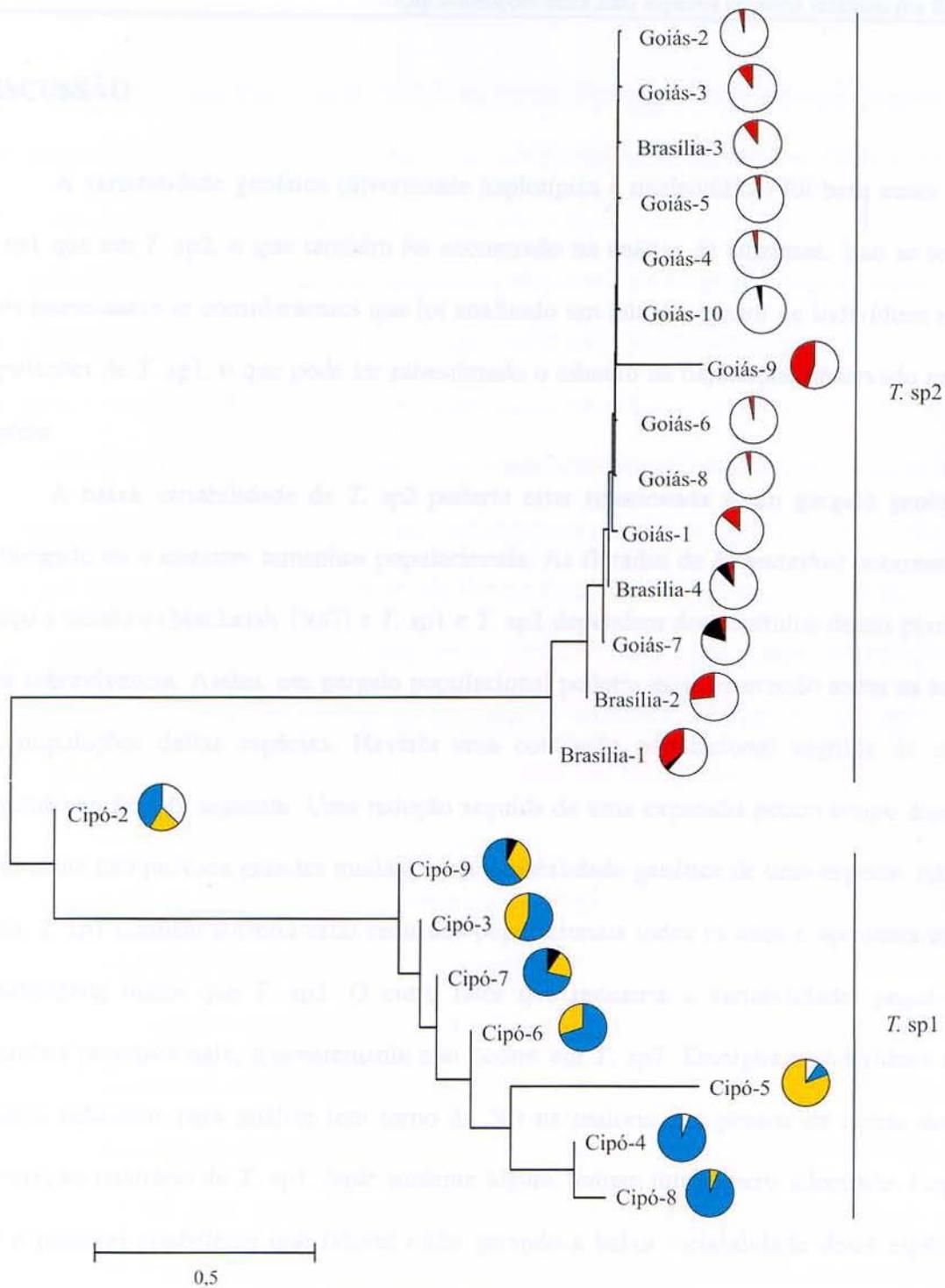


Figura 4: Dendrograma (NJ) das diferenças nucleotídicas entre as populações (Nei & Li 1979) das duas espécies. Os gráficos indicam a frequência das seguintes categorias: haplótipos compartilhados entre as espécies, A (branco) e B (preto); haplótipo comum em *T. sp1*, J (azul); todos os haplótipos raros em *T. sp1* (amarelo); todos os haplótipos raros em *T. sp2* (vermelho).

DISCUSSÃO

A variabilidade genética (diversidade haplotípica e nucleotídica) foi bem maior em *T. sp1* que em *T. sp2*, o que também foi encontrado na análise de isozimas. Isso se torna mais interessante se considerarmos que foi analisado um número menor de indivíduos e de populações de *T. sp1*, o que pode ter subestimado o número de haplótipos observado nesta espécie.

A baixa variabilidade de *T. sp2* poderia estar relacionada a um gargalo genético prolongado ou a menores tamanhos populacionais. As floradas de *Eremanthus* ocorrem de março a outubro (MacLeish 1987) e *T. sp1* e *T. sp2* dependem dos capítulos destas plantas para sobrevivência. Assim, um gargalo populacional poderia estar ocorrendo todos os anos nas populações destas espécies. Haveria uma contração populacional seguida de uma expansão na florada seguinte. Uma redução seguida de uma expansão pouco tempo depois geralmente não provoca grandes mudanças na variabilidade genética de uma espécie. Além disso, *T. sp1* também sofreria estas reduções populacionais todos os anos e apresenta uma variabilidade maior que *T. sp2*. O outro fator que reduziria a variabilidade, pequenos tamanhos populacionais, aparentemente não ocorre em *T. sp2*. Emergiram indivíduos em número suficiente para análise (em torno de 30) na maioria dos pontos de coleta desta espécie, ao contrário de *T. sp1*, onde somente alguns tinham um número adequado. Logo, não é possível estabelecer que fatores estão gerando a baixa variabilidade desta espécie. Outros estudos são necessários para tentar inferir que processos estão gerando essa baixa variabilidade.

Além da maior variabilidade, *T. sp1* também apresentou uma maior estruturação populacional em relação a *T. sp2*. É interessante notar que a maior distância entre os pontos

de coleta de *T. sp1* é 0,9 Km e de *T. sp2* é de 159,54 Km. Assim, apesar de próximas geograficamente, a primeira apresenta maior diferenciação interpopulacional do que da segunda, o que poderia ser causado por alguma barreira física ao fluxo gênico entre as populações. Uma discussão mais detalhada das características de cada local foi feita no capítulo anterior. Basicamente, na Serra do Cipó, o relevo é bem mais acidentado e a vegetação é mais densa na faixa em que *Eremanthus* ocorre (uma transição entre cerrado e campo rupestre) do que em Goiás e Brasília.

Segundo Sperling & Harrinson (1994), espécies com grande tamanho efetivo populacional e/ou uma estrutura populacional subdividida tenderão a manter maiores quantidades de diversidade do mtDNA, tanto como diversidade nucleotídica nas populações quanto como diversidade de seqüências entre elas. A alta diversidade do mtDNA que foi observada em *T. sp1* deve estar relacionada à estruturação populacional observada.

Não foi observado padrão temporal nem espacial na distribuição dos haplótipos nas populações das duas espécies. *T. sp2* apresentou um haplótipo no centro de uma árvore de haplótipos, com derivados conectados a ele independentemente por ramos curtos. Além disso, o haplótipo mais comum estava em alta freqüência e os demais eram raros. Segundo Avise (2000), um padrão assim seria consequência de uma expansão populacional recente. Como *T. sp2* foi descoberta recentemente (capítulo um desta tese) existem poucas informações sobre sua distribuição geográfica e amplitude de hospedeiros, o que limita as inferências sobre eventos históricos responsáveis pelos padrões observados. As populações no extremo da distribuição desta espécie poderiam ter chegado ao Cipó e entrado em contato com *T. sp1*, ou poderia ter havido um expansão populacional recente em *T. sp2*.

Algumas populações de *T. sp1* apresentam haplótipos que são encontrados em frequências elevadas em *T. sp2*. Isso pode ser um indício de basicamente dois eventos: retenção de haplótipo ancestral e introgressão.

Se a separação das espécies foi recente, os haplótipos compartilhados poderiam ser retenção de haplótipos ancestrais. Os caracteres morfológicos derivados teriam surgido rápida e recentemente, e essa diferenciação ainda não poderia ser vista no mtDNA. Alguns autores (Lansman *et al.* 1981, Avise *et al.* 1983, Neigel & Avise 1985, Avise 1986) demonstraram teórica e empiricamente que para espécies que divergiram recentemente, as filogenias de mtDNA poderiam ser afetadas por polimorfismo ancestral retido. Ao longo do tempo, a extinção estocástica de linhagens eliminaria mtDNAs com estados ancestrais, enquanto mtDNAs com estados derivados seriam criados por mutação (Neigel & Avise 1986, Tajima 1983).

Considerando a retenção de haplótipo ancestral, podemos fazer inferências sobre a origem das duas espécies. Teríamos 3 hipóteses: esses haplótipos podem ser compartilhados porque *T. sp2* originou *T. sp1*, ou vice-versa, ou porque o ancestral que deu origem às duas possuía esses haplótipos. Corroborando a hipótese de que *T. sp2* teria originado *T. sp1* temos que um dos haplótipos compartilhados, o A, é o mais comum em *T. sp2*. A possibilidade de *T. sp1* ter originado *T. sp2* é favorecida por *T. sp1* ter uma maior variabilidade que *T. sp2*. Populações originais geralmente têm uma maior variabilidade que as suas derivadas. Entretanto, em um trabalho com quatro espécies de *Lychnophora* com diferentes amplitudes de distribuição, observou-se que a espécie com distribuição mais restrita (microendêmica) também apresentava a maior variabilidade (Azevedo com. pess.). Talvez populações tropicais ou de regiões naturalmente fragmentadas (campo rupestre) apresentem um padrão de variabilidade genética diferente do descrito anteriormente. Por

outro lado, as duas espécies poderiam ter surgido a partir de um ancestral comum que possuía esses haplótipos, que teriam permanecido nestas populações. Entretanto, com os dados obtidos neste trabalho e com a falta de informações sobre aspectos ecológicos e comportamentais destas espécies, os processos que deram origem a elas não podem ser inferidos.

A introgressão também poderia explicar o compartilhamento de haplótipos. Ela seria resultado de acasalamento entre indivíduos das duas espécies. Devido à ausência de indivíduos de morfologia intermediária, a suspeita de hibridação entre as espécies não foi inicialmente levantada. Os exemplos de introgressão geralmente envolvem espécies próximas em simpatria ou zonas de contato secundário (Ruedi *et al.* 1997; Goodman *et al.* 1999). Neste caso, a região da Serra do Cipó seria uma zona de contato entre as duas espécies.

Somente dados mitocondriais não permitem a detecção de eventos de introgressão, a não ser que a composição genética das espécies seja bem conhecida antes da hibridação. Se padrões indicativos de introgressão também forem observados com um marcador nuclear, a hipótese de retenção de polimorfismo ancestral pode ser descartada. No capítulo anterior, também houve indícios de fluxo gênico interespecífico com um marcador nuclear (isozimas) em *T. sp1*, na população Cipó-2. Esta amostra foi coletada em 2000 e também apresentou indivíduos de *T. sp2*. Nela, o haplótipo A, característico de *T. sp2*, estava em uma frequência alta. As outras populações de *T. sp1* em que o haplótipo A também ocorreu (Cipó-4 e Cipó-5) foram coletadas no ano seguinte e podem ser resultado de cruzamentos entre fêmeas híbridas e machos de *T. sp1*. Nessas populações, que foram coletadas em 2001, a frequência de A é bem mais baixa e não deve ser resultado de uma nova introgressão. O haplótipo B, que ocorre em duas populações de *T. sp1* (Cipó-7 e Cipó-9) e

em cinco de *T. sp2* (Brasília-1, Brasília-4, Goiás-7, Goiás-9 e Goiás-10), está apenas a um passo mutacional de A. Seu surgimento poderia ter ocorrido independentemente nas duas espécies, ele poderia ser normalmente raro e não ter sido amostrado antes, ou poderia ser retenção de um haplótipo ancestral.

Feder *et al.* (1999) descreveram um evento de introgressão entre as espécies crípticas *Rhagoletis zephyria* e *R. pomonella*, que também foi detectado utilizando-se isozimas e RFLP do mtDNA. Estes autores também encontraram um compartilhamento de haplótipos entre as espécies em algumas populações, em uma zona de contato entre elas. Há registros de hibridação em um outro gênero de tefritídeos, no complexo de espécies crípticas *Anastrepha fraterculus*, entre as espécies conhecidas como *A. fraterculus* sp.1 e *A. fraterculus* sp.2 (Selivon *et al.* 1999).

Na hibridação, provavelmente machos de *T. sp1* copularam com fêmeas de *T. sp2*, visto que um dos haplótipos compartilhados (A) é o mais freqüente em *T. sp2*. Como não obtivemos novamente indivíduos de *T. sp2* da Serra do Cipó (apesar de um grande esforço de coleta), não foi possível verificar se também ocorre introgressão em *T. sp2*. O haplótipo B é raro nas duas espécies e não permite esclarecer a relação entre elas.

Os efeitos da introgressão na variabilidade genética de indivíduos e populações, e entre populações e espécies podem ser extremamente difíceis de inferir. Esses efeitos podem passar despercebidos se um estudo envolve somente uma das espécies. Como uma medida importante, particularmente em grupos onde a hibridação é uma possibilidade, os estudos filogenéticos moleculares não devem basear-se em dados de seqüência de um único indivíduo como sendo representativo de uma espécie (Rees *et al.* 2003).

Neste trabalho, a introgressão parece não ter afetado a integridade genética das espécies, pois as suas evidências não permaneceram por muitas gerações. Provavelmente,

algum tipo de isolamento reprodutivo mantém essa integridade genética, quer prevenindo totalmente a hibridação, quer evitando que ela ocorra livremente. Em muitas espécies crípticas de tefritídeos, o isolamento reprodutivo é o local do acasalamento. Comumente, há uma tendência a acasalar e ovipor na mesma espécie de planta hospedeira na qual se alimentaram enquanto larvas (Feder & Filchak 1999). Isso funciona como uma barreira para espécies próximas com diferentes hospedeiros. Entretanto, como *T. sp1* e *T. sp2* parasitam as mesmas espécies de plantas (do gênero *Eremanthus*), o local de acasalamento não funciona como uma barreira para elas. Experimentos futuros podem caracterizar o comportamento de corte e oviposição de cada espécie e esclarecer se existe também alguma barreira comportamental ao acasalamento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- a) Os morfos claro e escuro de *T. sp1* são propostos como duas espécies crípticas, com o morfo escuro sendo referido como *T. sp1* e o morfo claro como *T. sp2*.
- b) *T. sp1* possui uma alta variabilidade, maior que de *T. sp2*. A variabilidade de *T. sp1* é próxima a de várias outras espécies de Tephritidae e a de *T. sp2* aproxima-se somente da heterozigosidade de populações introduzidas de *Ceratitis capitata*. Não é possível estabelecer que fatores estão gerando a baixa variabilidade de *T. sp2*. Outros estudos são necessários para tentar inferir que processos estão gerando essa baixa variabilidade.
- c) *T. sp1* possui maior estruturação populacional que *T. sp2*, com ambos os marcadores. Isso pode ser resultado de barreiras físicas (vegetação e relevo) ao fluxo gênico mais intensas.
- d) Não é possível estabelecer relações de origem entre as espécies. Há três hipóteses: *T. sp2* pode ter dado origem a *T. sp1*, ou vice-versa, ou ambas podem ter se originado de um ancestral comum.
- e) Há indícios de introgressão entre *T. sp1* e *T. sp2*. Esse fato foi verificado tanto com isozimas quanto com RFLP, na coleta em que as duas espécies ocorreram juntas, o que fortalece a hipótese. A hibridação parece acontecer entre fêmeas de *T. sp2* e machos de *T. sp1*. Entretanto, como apenas em um dos anos de coleta as populações ocorreram simpatricamente e foi feita apenas a análise de isozimas com *T. sp2* no Cipó, algum fato novo pode surgir em uma análise de RFLP desta espécie no Cipó.
- f) A análise de RFLP é capaz de detectar a hibridação algumas gerações depois de ela ter ocorrido, ao contrário de isozimas. Isto é possível devido à transmissão direta do

mtDNA (sem recombinação). Em isozimas, esses alelos, que já estavam em frequência baixa, logo se dispersaram nas gerações seguintes, perdendo-se o sinal de introgressão.

- g) Algum tipo de isolamento reprodutivo parece manter a integridade genética destas espécies. A zona de contato entre elas é a região da Serra do Cipó (Santana do Riacho-MG). Estudos futuros podem esclarecer se também há alguma barreira comportamental entre elas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arias, M C. & Infante-Malachias, M. E. 2001. RFLP: o emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In: Matioli, S. R. (ed.) **Biologia Molecular e Evolução**. Editora Holos, Riberão Preto.
- Avise, J. C. 1986. Mitochondrial DNA and evolutionary genetics of higher animals. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B** 312: 325-342.
- Avise, J. C. 2000. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard University Press, Cambridge.
- Avise, J. C.; Shapira, J. F.; Daniel, S. W.; Aquadro, C. F. & Lansman, R. A. 1983. Mitochondrial DNA differentiation during the speciation process in *Peromyscus*. **Molecular Biology and Evolution** 1: 38-56.
- Avise, J. C.; Arnold, J.; Ball, R. M.; Berningham, E.; Lamb, T.; Neigel, T. E.; Reeb, C. A. & Saunders, N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics** 18: 489-522.
- Ayala, F. J. 1983. Enzymes as taxonomic characters. In: Oxford, G. S. & Rollinson, D. (eds.). **Protein polymorphism: adaptive and taxonomic significance**. Academic Press, London.
- Azeredo-Espin, A. M. L.; Schroder, R. F. W.; Huettel, M. D. & Sheppard, W. S. 1991. Mitochondrial DNA variation in geographic population of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa- Decemlineata* (Coleoptera, Chrisomelidae). **Experientia** 47: 483-485.
- Bellows, T. S.; Perring, T. M.; Gill, R. J. & Headrick, D. H. 1994. Description of a species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). **Annals of the Entomological Society of America** 87: 195-206.
- Berlocher, S. H. 1995. Population structure of the blueberry maggot, *Rhagoletis mendax*. **Heredity** 74: 542-555.
- Berlocher, S. H. 1999. Host race or species? Allozyme characterization of the “flowering dogwood fly”, a member of the *Rhagoletis pomonella* complex. **Heredity** 83:652-662.

- Berlacher, S. H. & Bush, G. L. 1982. An eletrophoretic analysis of *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae) phylogeny. **Systematic Zoology** **31**:136-155.
- Bermingham, E.; Seutin, G. & Ricklefs, R. E. 1996. Regional approaches to conservation biology: RFLP, DNA sequencing and Caribbean birds. In: Smith, T. B. & Wayne, R. K. **Molecular genetics approaches in conservation**. Oxford University Press, New York.
- Bernays, E. A. 1998 Evolution of feeding behaviour in insect herbivores: success seen as different ways to eat without being eaten. **Bioscience** **48**: 35-44.
- Borchiellini, C.; Chombard, C.; Lafay, B. & Boury-Esnault, N. 2000. Molecular systematics of sponges (Porifera). **Hydrobiologia** **420**: 15-27.
- Brierley, A. S.; Rodhouse, P. G.; Thorpe, J. P. & Clarke, M. R: 1993. Genetic-evidence of population heterogeneity and cryptic speciation in the ommastrephid squid *Martialia hyadesi* from the Patagonia shelf and Antarctic polar frontal zone. **Marine Biology** **116**: 593-602.
- Caterino, M. S. & Sperling, F. A. H. 1999. *Papilio* phylogeny based on mitochondrial cytochrome oxidase I and II genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **11**: 122-137.
- Caterino, M. S.; Cho, S. & Sperling, F. A. H. 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of Babel. **Annual Review of Entomology** **45**:1-54.
- Duffy, J. E. 1996. Species boundaries, specialization, and the radiation of sponge-dwelling alpheid shrimp. **Biological Journal of the Linnean Society** **58**: 307-324.
- Dujardin, J. P. & LePont, F. 2000. Morphometrics of a neotropical sandfly subspecies, *Lutzomyia carrerai thula*. **Comptes Rendus de L Academie des Sciences Serie Iii-Sciences de la Vie-Life Sciences** **323**: 273-279.
- Dujardin, J. P.; LePont, F.; Cruz, M.; Leon, R.; Tarrieu, F.; Guderian, R.; Echeverria, R. & Tibayrenc, M. 1996. Cryptic speciation in *Lutzomyia* (Nyssomyia) *trapidoi* (Fairchild & Herting) (Diptera: Psychodidae) detected by multilocus enzyme electrophoresis. **America Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **54**: 42-45.
- Excoffier, L.; Smouse, P. E. & Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** **131**: 479-491.

- Feder, J. L.; Chilcote, C. A. & Bush, G. L. 1989. Are the apple maggot, *Rhagoletis pomonella*, and blueberry maggot, *R. mendax*, distinct species? Implications for sympatric speciation. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 51:113-123.
- Feder, J. L. & Filchak, K. E. 1999. It's about time: the evidence for host plant mediates selection in the apple maggot fly, *Rhagoletis pomonella*, and its implications for fitness trade-offs in phytophagous insects. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 91: 211-225.
- Feder, J. L.; Williams, S. M.; Berlocher, S. H. ; McPheron, B. A. & Bush, G. L. 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.
- Foot, R. H.; Blanc, F. L. & Norrbom, A. L. 1993. **Handbook of the fruit flies (Diptera: Tephritidae) of America North of Mexico**. Comstock, Ithaca and London.
- Gomez, A. & Snell, T. W. Sibling species and cryptic speciation in the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera). **Journal of Evolutionary Biology** 9: 953-964.
- Goodman, S.; Barton, N.; Swanson, G.; Abernethy, K. & Pemberton, J. 1999. Introgression through rare hybridization: a genetic study of a hybrid zone between Red and Sika Deer (genus *Cervus*) in Argyll, Scotland. **Genetics** 152: 35-371.
- Goudet, J. 2001. **FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3)**. Institute of Ecology, Biology Building, UNIL, Lausanne, Switzerland. <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Headrick, D. H. & Goeden, R. D. 1998. The biology of nonfrugivorous fruit flies. **Annual Review of Entomological Society** 43: 217-241.
- Heiman, M. 1997. **Webcutter 2.0**. <http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>
- Henry, C. S. 1994. Singing and cryptic speciation in insects. **Trends in Ecology and Evolution** 9: 388-392.
- Jermolov, T. 1984. Evolution of insect/host plant relationships. **American Naturalist** 124: 609-630.
- Jousson, O.; Bartoli, P. & Pawlowski, J. 2000. Cryptic speciation among intestinal parasites (Trematoda: Digenea) infecting sympatric host fishes (Sparidae) **Journal of Evolutionary Biology** 13: 778-785.

- Knappertsbusch, M. 2000. Morphological evolution of the coccolithophorid *Calcidiscus leptoporus* from Early Miocene to recent. **Journal of Paleontology** **74**: 712-730.
- Kruskal, J. B. 1956. On the shortest spanning subtree of a graph and the traveling salesman problem. **Proceedings of the American Mathematical Society** **7**:48-50.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Jacobsen, I & Nei, M. 2000. **MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 2.1**. <http://www.megasoftware.net>
- Landry, B. ; Powell, J. A. & Sperling, F. A. H. 1999. Systematics of the *Argyrotaenia franciscana* (Lepidoptera: Tortricidae) species group: evidence from mitochondrial DNA. **Annals of the Entomological Society of America** **92**: 40-46.
- Lansman, R. A.; Shade, R. O.; Shapira, J. F & Avise, J. C. 1981. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial sequence relatedness in natural populations. III. Techniques and potential applications. **Journal of Molecular Evolution** **17**: 214-226.
- Leberg, P. L. 1996. Applications of allozyme electrophoresis in conservation biology. In: Smith, T. B. & Wayne, R. K. (eds.) **Molecular genetics approaches in conservation**. Oxford University Press, New York.
- Lewinsohn, T. M. 1988. **Composição e tamanho de fauna associadas a capítulos de compostas**. Tese de doutorado. UNICAMP, Campinas.
- MacLeish, N. F. F. 1987. Revision of *Eremanthus* (Compositae: Vernonieae). **Annals of the Missouri Botanical Garden** **74**: 265-290.
- Malavasi, A. & Morgante, J. S. 1982. Genetic variation in natural populations of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). **Revista Brasileira de Genética** **2**: 263-278.
- Mardulyn, P.; Milinkovitch, M. C. & Pasteels, J. M. 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.
- Mayr, E. 1963. **Animal species and evolution**. Harvard University Press, Cambridge.
- McPherson, B. A. 1990. Genetic structure of apple maggot fly (Diptera: Tephritidae) populations. **Annals of the Entomological Society of America** **83**: 568-577.

- McPherson, B. A.; Jorgensen, C. D. & Berlocher, S. H. 1988. Low genetic variability in a Utah cherry-infesting population of the apple maggot, *Rhagoletis pomonella*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **46**: 155-160.
- Menken, S. B. J. 1989. Eletrophoretic studies on geographic populations, host races, and sibling species of insect pests. In: Losdale, H. L. & den Hollander, J. (eds.) **Eletrophoretic studies on agricultural pests**. Systematics Association Special Vol. 39. Clarendon Press, Oxford.
- Morgante, J. S.; Malavasi, A. & Bush, G. L. 1980. Biochemical systematics and evolutionary relationships of neotropical *Anastrepha*. **Annals of the Entomological Society of America** **73**: 622-630.
- Murphy, R. W.; Sites, J. W.; Buth, D. G. & Haufler, C. H. Proteins: isozyme electrophoresis. In: Hillis, D. M.; Moritz, C. & Mable, B. K. (eds.) 1996. **Molecular systematics**. Second edition. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts.
- Musyl, M. K. & Keenan, C. P. 1996. Evidence for cryptic speciation in Australian freshwater eel-tailed catfish, *Tandanus Tandanus* (Teleostei:Plotosidae). **Copeia** **3**: 526-534.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. **American Naturalist** **106**: 283.
- 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, W. H. 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.
- Nei, M. & Miller, J. C. 1990. A simple method for estimating average number of nucleotide substitution within and between populations from restriction data. **Genetics** **125**: 873-879.
- Neigel, J. E. & Avise, J. C. 1986. Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. In: Nevo, E. & Karlin, S. (eds.). **Evolutionary processes and theory**. Academic Press, New York.
- Norrbom, A. L.; Carrol, L. E. & Freidberg, A. 1998. Status of knowledge of Tephritid Systematics. In: Thompson, F. C.; Norrbom, A. L.; Carrol, L. E.; Freidberg, A.; White,

- I. M. 1998. **Fruit Fly Biosystematic Information Database and Expert System**. Backhuys Publishers, Leiden.
- Norris, R. D. & de Vargas, C. 2000. Evolution all at sea. **Nature** **405**: 23-24.
- Norwak, B. B. & Lanteri, A. A. 1996. *Aramigus uruguayensis* (Coleoptera: Curculionidae), a new species based on mitochondrial DNA and morphological characters. **Entomological News** **107**: 311-316.
- Ochando, M. D. & 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.
- Payne, J. A. & Berlocher, S. H. 1995. Phenological and eletrophoretic evidence for a new blueberry-infesting species in the *Rhagoletis pomonella* (Diptera:Tephritidae) sibling species complex. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **75**: 183-187.
- Pinto, J. D.; Stouthamer, R. & Platner, G. R. 1997. A new cryptic species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) from the Mojave Desert of California as determined by morphological, reproductive and molecular data. **Proceedings of the Entomological Society of Washington** **99**: 238-247.
- Prado, P.I.K.L.; Lewinsohn, T.M. 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, P. I.; Lewinsohn, T. M.; Almeida, A. M.; Norrbom, A. L.; Buys, B. D.; Macedo, A. C. & Lopes, M. B. 2002. The fauna of Tephritidae (Diptera) from capitula of Asteraceae in Brazil. **Proceedings of the Entomological Society of Washington** **104**: 1007-1028.
- Prim, R. C. 1957. Shortest connection networks and some generalizations. **Bell Systems Technical Journal** **36**: 1389-1401.
- Raymond, M. & Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.2) population genetic software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity** **86**: 248-249.
- Rees, D. J.; Dioli, M. & Lawrence, R. K. 2003. Molecules and morphology: evidence for cryptic hybridization in African *Hyalomma* (Acari: Ixodidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution** **27**: 131-142.
- Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution** **43**: 223-225

- Rizzini, C. T. 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 Vernoniaeae. **Smithsonian Contributions to Botany 89**.
- Roderick, G. K. 1996. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. **Annual Review of Entomology 41**:325-352.
- Rohlf, F. J. 1973. Algorithm 76. Hierarchical clustering using the minimum spanning tree. **The Computer Journal 16**: 93-95.
- Ruedi, M; Smith, M. F. & Patton, J. L. 1997. Phylogenetic evidence of mitochondrial DNA introgression among pocket gophers in New Mexico (family Geomyidae). **Molecular Ecology 6**: 453-462.
- Sanjuan, A.; PerezLosada, M. & Rolan, E. 1997. Allozyme evidence for cryptic speciation in sympatric population of *Nassarius* spp. (Mollusca:Gastropoda). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 77**: 773-784.
- Schaffer, H. E. & Sederoff, R.R. 1981. Improved estimation of DNA fragment lengths from agarose gels. **Analytical Biochemistry 115**: 113-122
- Schneider, S.; Roessli, D. & Excoffier, L. 2000. **Arlequin version 2000: a software for population genetics data analysis**. Geneva, Switzerland. <http://anthro.unige.ch/arlequin>.
- Schonrögge, K.; Barr, B.; Wardlaw, J. C.; Napper, E.; Gardner, M. G.; Breen, J.; Elmes, G. W. & Thomas, J. A. 2002. When rare species become endangered: cryptic speciation in myrmecophilous hoverflies. **Biological Journal of the Linnean Society 75**: 291-300.
- Selivon, D.; Perondini, A. L. P. & Morgante, J. S. 1999. Haldane's rule and other aspects of reproductive isolation observed in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). **Genetics and Molecular Biology 22**: 507-510.
- Semir, J. 1991. **Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniaeae: Compositae)**. Tese de doutorado. UNICAMP, Campinas.
- Serra, M; Galiana, A. & Gomez, A. 1997. Speciation in monogonont rotifers. **Hydrobiologia 358**: 63-70.

- Shaw, A. J. 2000. Molecular phylogeography and cryptic speciation in the mosses, *Mielichhoferia elongata* and *M. mielichhoferiana* (Bryaceae). **Molecular Ecology** **9**: 595-608.
- Shaw, C.R. & Prasad, R. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes- a compilation of recipes. **Biochemical genetics** **4**:297-320.
- 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.
- Sperling, F. A. H. & Harrison, R. G. 1994. Mitochondrial DNA variation within and between species of the *Papilio machaon* group of swallowtail butterflies. **Evolution** **48**: 408-422.
- Sperling, F. A. H.; Landry, J-F. & Hickey D. A. 1995. DNA-based identification of introduced emine moth species in North America (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Annals of the Entomological Society of America** **88**:155-162.
- Sperling, F. A. H.; Spencer, J. R. & Andersen, N. M. 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.
- Sperling, F. A. H.; Raske, A. G. & Otvos, I. S. 1999. Mitochondrial DNA sequence variation among populations and host races of *Lambdina fiscellaria* (Gn.) (Lepidoptera: Geometridae). **Insect Molecular Biology** **8**:97-106.
- Steck, G. J. 1991. Biochemical systematics and population genetic structure of *Anastrepha fraterculus* and related species (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America** **84**: 10-28. Stone, A. 1942. **The fruitflies of the genus *Anastrepha***. USDA Miscellaneous Publication 439.
- Swofford, D. L. & Selander, R. B.1981. BIOSYS I: a FORTAN program for the comprehensive analysis of eletrophoretic data in population genetics and systematics. **Journal of Heredity** **72**: 281-283.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationships of DNA-sequences in finite populations. **Genetics** **105**: 437-460.

- Templeton, A. R. 1983. Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of human and the apes. **Evolution** **37**: 221-244.
- Thompson, J.N. Coevolution and alternative hypotheses on insect plant interactions. **Ecology** **69**: 893-895.
- Thorpe, J. P. 1982. The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics** **13**:139-168.
- Thorpe, J. P. & Solé-cava, A. M. 1994. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. **Zoologica Scripta** **23**: 3-18.
- Van der Bank, H.; 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.
- de Vargas, C.; Norris, R.; Zaninetti, L.; Gibb, S. W. & Pawlowski, J. 1999. Molecular evidence of cryptic speciation in planktonic foraminifers and their relation to oceanic provinces. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** **96**:2864-2868.
- Weir, B. S. & Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution** **38**:1358-1370.
- White, I. M. 1988. **Tephritid flies (Diptera :Tephritidae). Handbooks for the identification of British insects Vol. 10 (5a)**. Royal Entomological Society of London, Londres.
- White, L. M. & Elson-Harris, M. M. 1992. **Fruit flies of economical significance: their identification and bionomics**. CAR International, Chicago.
- Wright, S. 1978. **Evolution and the genetics of populations, Vol. 4. Variability within and among natural populations**. The University of Chicago Press, Chicago.
- Yotoko, K. S. C. 2003. **Genes mitocondriais e hipóteses filogenéticas no gênero *Tomoplagia* (Diptera: Tephritidae) e no grupo *tripunctata* (Diptera: Drosophilidae)**. Tese de Doutorado. UNICAMP, Campinas.
- Zucchi, R. A. 1981. *Anastrepha* Schiner, 1868 (Diptera, Tephritidae): novas sinonimias. **Revista Brasileira de Entomologia** **25**: 289-294.

Zwölfer, H. 1983. Life systems and strategies of resource exploitation in tephritids.
In:Cavalloro (ed.). **Fruit flies of economic importance**. A. A. Balkema, Rotherdam.