

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

" ASPECTOS DA BIOLOGIA, VARIABILIDADE  
GENÉTICA E ESTRUTURA SOCIOGENÉTICA DOS  
AGREGADOS DE *DIGELASINUS DIVERSIPES* (KIRBY,  
1882) (HYMENOPTERA: ARGIDAE) "

Daniele Boraschi

São Carlos – SP

2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

" ASPECTOS DA BIOLOGIA, VARIABILIDADE GENÉTICA E  
ESTRUTURA SOCIOGENÉTICA DOS AGREGADOS DE  
*DIGELASINUS DIVERSIPES* (KIRBY, 1882)  
(HYMENOPTERA: ARGIDAE) "

Daniele Boraschi

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Genética e Evolução do  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
da Universidade Federal de São Carlos,  
como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Mestre em Ciências  
(Ciências Biológicas), área de  
concentração: Genética e Evolução.

São Carlos - SP

2003

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

B726ab

Boraschi, Daniele.

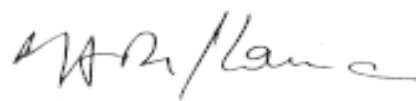
Aspectos da biologia, variabilidade genética e estrutura sociogenética dos agregados de *Digelasinus diversipes* (Kirby, 1882) (Hymenoptera: Argidae) / Daniele Boraschi. -- São Carlos : UFSCar, 2003.

82 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Genética de populações. 2. Aspectos biológicos. 3. Symphyta. I. Título.

CDD: 575.15 (20<sup>a</sup>)



---

Prof. Dr. Marco Antônio Del Lama  
Orientador

## **Agradecimentos**

A realização deste trabalho só foi possível graças à participação direta ou indireta de algumas pessoas, às quais eu gostaria de agradecer.

Aos meus pais, Célio e Noely, que são as pessoas mais importantes para mim, agradeço por terem me ensinado desde pequena a lutar pelo que gostamos, sempre mostrando o lado certo e bom da vida, mesmo nas dificuldades; por terem me ajudado a me tornar a pessoa que sou; e mesmo não compreendendo direito o meu trabalho, a distância nos fins de semana e essa mistura de saudade e alegria, me respeitaram e apoiaram minhas decisões.

Às minhas irmãs, Graciele (Kely) e Mirele (Meirão), por agüentarem minhas brincadeiras fora de hora, e por estarem sempre de braços abertos toda vez que eu volto para casa.

Ao Prof. Marco Antonio Del Lama, agradeço por estar sempre presente na minha (curta) estrada científica, me acompanhando desde a graduação e me ajudando a crescer; pela orientação e exemplo dentro do laboratório, que por muitas vezes se refletiu na minha vida pessoal.

À Profa. Sílvia Nassif Del Lama, agradeço pela convivência sempre alegre e, mesmo sem perceber, por me mostrar que podemos ser idealistas, e que sempre é possível realizar o que sonhamos.

Ao Rogério, agradeço por ser meu namorado, meu amigo, meu porto seguro; por me incentivar todas as vezes que eu estive desmotivada, por comemorar comigo todos os momentos de alegria, por me ajudar a chegar até o fim (eu não teria conseguido sem você); obrigado por fazer parte da minha vida, da minha família e por compartilhar a sua vida comigo.

À minha família de São Carlos (que está quase desfeita, mas que sempre será família), Elizângela (Eli), Marcelo (Má), Liano (Viado) e Silvana, agradeço pelos almoços (e pelas sobremesas) de domingo, que ajudavam a desestressar no fim de semana, e pelas tardes produtivas na 'biblioteca', que ajudavam a desestressar durante a semana.

Aos amigos do laboratório, Thais, Carlos, Carol (muito bem, parabéns), Iara, Kitty (e sua casa de campo), Alê, Mateus e Keiko, por tornarem o ambiente de trabalho um local descontraído, alegre e festivo (regado a tampão fosfato), que faz a gente esquecer que o mundo lá fora é tão competitivo.

Ao Rui, à Patrícia e à Carol, agradeço pelas fotos, pelas longas conversas, pelos incentivos e pelas críticas, pelo companheirismo nas horas de lazer e nas viagens ao Jataí.

À Isabel (Bel), agradeço pela ajuda prá lá de técnica durante a fase experimental (segurando as bandas no gel) e por ser amiga de todas as horas e receitas.

As ‘meninas’ da secretaria, Rose, Rê e Tati, por sempre nos atender com um sorriso no rosto, mesmo quando aparecemos nas horas erradas e com problemas cabeludos para se resolver.

Aos meus amigos de São Carlos, Ive (Ivão), Daniel (Nak’s), Leonardo (Léo), Ana Karina, Alê (Enéas), Alê (Jaca), Magda (Má) e Anselmo (Mitchus), agradeço por tornarem a vida em São Carlos mais fácil, principalmente nas madrugadas; à Paula (Pê) (longe mas sempre presente), Camila (Cacá), Renata Canteiro (Rê grande) e Renata Pires (Rê pequena), agradeço por serem minhas amigas, vocês me fazem muita falta; à Talita (Tatá), Sumaia (Sú) e Tatiana (Tatão) (muito bem flipper!) minhas amigas ‘de casa’, pelas conversas longas, pelas festas longas e por segurarem a barra comigo, principalmente neste ‘finzinho’ estressado.

Aos meus vizinhos e amigos de Americana, Jô, Mané, Hugo, Neidinha, Maria Ester, Zé Roberto, agradeço pelo apoio que vocês me deram e à minha família, durante todos estes anos. À Fernanda (Fer) que mesmo estando longe, nunca se afastou demais, e ao Samuel (Samuca) por ser sempre meu amigo (força que você também chega lá), e me telefonar toda vez que é meu aniversário.

À CAPES pelo apoio financeiro.

## Lista de Figuras

Figura 1	Fotos de Symphyta em diferentes estágios de desenvolvimento. As fotos A,B e C são de exemplares adultos, enquanto que as fotos D, E e F são de exemplares na fase larval, que apresentam comportamento gregário. ....	4
Figura2	Dendrograma ilustrando a filogenia dentro de Hymenoptera (modificado de Hunt, 1999). ....	5
Figura 3	Foto de ovipositor serrilhado de <i>Arge</i> sp (Argidae). Este tipo de ovipositor é característico de Symphyta. ....	7
Figura 4	Desenho de larva eruciforme de <i>Neodiprion lecontei</i> (Diprionidae), mostrando sua semelhança morfológica com as lagartas de Lepidoptera. ....	8
Figura 5	Fêmea de <i>Digelasinus diversipes</i> realizando postura em folha de <i>Eugenia glazioviana</i> (A). Em (B) a fêmea caminha sobre sua oviposição .....	12
Figura 6	Ciclo de vida de <i>Digelasinus diversipes</i> . Por volta de um mês após a oviposição as larvas eclodem e se alimentam durante cinco meses. Então, migram pelo caule da planta até bem próximo ao solo para encasular. As larvas podem ou não entrar em diapausa. ....	24
Figura 7	Emergência de machos e fêmeas de <i>Digelasinus diversipes</i> . Em (A) emergência de indivíduos de agregados coletados em 2000, e em (B) emergência de indivíduos de agregados coletados em 2001. ....	25

Figura 8	Emergência dos indivíduos nascidos em laboratório, dos agregados coletados nas duas áreas de estudo, nos dois anos consecutivos. O dia Zero corresponde ao dia em que o primeiro macho emergiu, os números positivos correspondem as fêmeas que emergiram antes deste dia, enquanto que os números negativos correspondem as fêmeas que emergiram depois deste dia. ....	26
Figura 9	Emergência das fêmeas em relação ao primeiro macho (dia Zero) em cada agregado. Os números positivos correspondem à fêmea que emergiu antes do primeiro macho, enquanto que os números negativos correspondem à última fêmea que emergiu depois do primeiro macho. ....	27
Figura 10	Porcentagem de parasitas associados (n = 100) aos agregados <i>Digelasinus diversipes</i> , emergidos no laboratório. ....	30
Figura 11	Fêmea de <i>Digelasinus diversipes</i> durante a oviposição. A seta mostra o aparelho ovipositor. Nos detalhes, a fêmea sobre a oviposição e uma folha onde toda a postura já foi realizada. ....	35
Figura 12	Construção dos agregados. As larvas gregárias constróem de maneira desordenada os casulos do agregado. No detalhe, o agregado aderido ao tronco da árvore hospedeira. ....	37
Figura 13	Padrões eletroforéticos de Esterases ( <i>Est1, Est2, Est3, Est4, Est5 e Est6</i> ) em amostras de <i>Digelasinus diversipes</i> , coletadas na EEJ – Luís Antônio. ....	39
Figura 14	Padrões eletroforéticos de Esterases, evidenciando a Est4. Em A está representado um gel Tris-citrato pH7,5, e em B um gel Histidina pH6,6. as setas indicam a mesma amostra. A variante 106 é evidenciada apenas no gel B. os números 1, 2 e 3 indicam, respectivamente, os fenótipos 112/100, 100 e 112/106. ....	42



Figura 15	Padrões eletroforéticos de Peptidases (PepA e PepD) em amostras de <i>Digelasinus diversipes</i> , coletadas na EEJ – Luís Antônio. Na região da PepA as amostras 13 e 18 representam os fenótipos 114/100 e 100, respectivamente. Na região da PepD os fenótipos homozigotos 106 e 100 estão representados pelas amostras 9, 10 (respectivamente), enquanto que o heterozigoto 106/100 é representado pela amostra 14. ....	43
Figura 16	Padrões eletroforéticos de Mpi em amostras de <i>Digelasinus diversipes</i> , coletadas na EEJ – Luís Antônio. Os fenótipos homozigotos 86, 100 e 93 estão representados pelas amostras 4, 6 e 18, enquanto que os fenótipos heterozigotos 100/93, 100/86 e 93/86 estão representados em 1, 7 e 9, respectivamente. ....	45
Figura 17	Padrões eletroforéticos de Pgm em amostras de <i>Digelasinus diversipes</i> , coletadas na EEJ – Luís Antônio. Os fenótipos homozigotos 100, 112 e 112/100 estão representados pelas amostras 3, 11 e 16, respectivamente. ....	48
Figura 18	Padrões eletroforéticos de Fosfatase ácida (Acp1, Acp2 e Acp3) em amostras de <i>Digelasinus diversipes</i> , coletadas na EEJ – Luís Antônio. Na região Acp1, os fenótipos 114, 114/100 e 100 podem ser observados nas amostras 10, 13 e 15, respectivamente. Em Acp2, os fenótipos 100, 100/80 e 80 podem ser observados nas amostras 4, 9 e 18, respectivamente. A região Acp3 não apresenta polimorfismo enzimático. ....	49
Figura 19	Dendrograma de distância genética segundo Nei (1978) para agregados de <i>Digelasinus diversipes</i> coletados na Lagoa dos Patos em 2000 e 2001. ....	54
Figura 20	Dendrograma de distância genética segundo Nei (1978) para agregados de <i>Digelasinus diversipes</i> coletados nas lagoas dos Patos e do Infernã. ....	55

Figura 21 Comparação entre as heterozigosidades encontradas neste estudo com os dados presentes na literatura. ....	67
---	----

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Sistemas enzimáticos, número de locos estudados (entre parênteses o número de locos polimórficos), sistema tampão de confecção do gel e condições de corrida onde foram feitas as análises eletroforéticas de <i>Digelasinus diversipes</i> . ....	21
Tabela 2	Total de adultos de <i>Digelasinus diversipes</i> emergidos em laboratório entre setembro de 2000 e janeiro de 2001. ....	28
Tabela 3	Número observado de células, número de indivíduos emergidos, razão sexual secundária e qui-quadrado para razões 2:1 e 3: 1, para os agregados coletados no ano de 2000, nas duas localidades estudadas. * indica valores significativos ( $\alpha = 0,05$ ). ....	32
Tabela 4	Número estimado de células, número de indivíduos emergidos, razão sexual secundária e qui-quadrado para razões 2:1 e 3: 1, para os agregados coletados no ano de 2001, nas duas localidades estudadas. * indica valores significativos ( $\alpha = 0,05$ ). ....	33
Tabela 5	Atividade relativa das esterases de <i>Digelasinus diversipes</i> frente a diferentes substratos. ....	40
Tabela 6	Freqüências alélicas (e respectivos desvios padrão), valores de $\chi^2$ de equilíbrio genético (número de indivíduos analisados entre parênteses), proporção de locos polimórficos (P), número médio de alelos (A), e heterozigosidade média observada (H) para os locos polimórficos em <i>Digelasinus diversipes</i> . * indica valores significativos ( $\alpha = 0,05$ ). ....	51
Tabela 7	Coeficientes da Estatística-F e suas significâncias, determinados a partir de locos enzimáticos de <i>Digelasinus diversipes</i> . * indicam valores significativos; <sup>NS</sup> indicam valores não significativos ( $\alpha = 0,05$ ). ....	53
Tabela 8	Parâmetros genéticos utilizados para comparações neste trabalho.	65

## Sumário

<b>Lista de Figuras</b> .....	iii
<b>Lista de Tabelas</b> .....	vii
<b>Resumo</b> .....	viii
<b>Abstract</b> .....	ix
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1 A Subordem Symphyta .....	3
1.1.1 Superfamília Tenthredinoidea .....	9
1.1.2 Estudos realizados com sínfitas Brasileiros .....	10
1.2 Genética de Populações de Symphyta .....	13
<b>2. Justificativa e Proposição</b> .....	16
<b>3. Material e Métodos</b> .....	18
3.1 Material .....	18
3.2 Métodos .....	18
3.2.1 Biologia de <i>Digelasinus diversipes</i> .....	18
3.2.2 Análise aloenzimática .....	20
3.2.2.1 Análise dos dados .....	22
<b>4. Resultados</b> .....	23
4.1 Biologia de <i>Digelasinus diversipes</i> .....	23
4.1.1 Ciclo de Vida .....	23
4.1.2 Razão Sexual .....	31
4.1.3 Cópula, Oviposição e Cuidado Maternal .....	31
4.1.4 Alimentação das Larvas .....	34
4.1.5 Capacidade suporte do hospedeiro .....	36
4.2 Análises Eletroforéticas .....	36
4.2.1 Sistemas Enzimáticos .....	38
4.2.2 Estimativa de diversidade genética .....	50
<b>5. Discussão</b> .....	56

5.1 Biologia de <i>Digelasinus diversipes</i> .....	56
5.1.1 Ciclo de Vida .....	56
5.1.2 Razão Sexual .....	58
5.1.3 Cópula, Oviposição e Cuidado Maternal .....	60
5.1.4 Alimentação das Larvas .....	61
5.1.5 Capacidade suporte do hospedeiro .....	63
5.2 Estrutura genética populacional .....	64
<b>6. Conclusão</b> .....	71
<b>7. Bibliografia</b> .....	73

## Resumo

Symphyta é uma Subordem de Hymenoptera cujos representantes são caracterizados por apresentarem caracteres primitivos, como a ausência da constrição abdominal. As larvas de Symphyta são fitófagas e se alimentam de forma gregária, o que faz com que algumas espécies, principalmente as de clima temperado, provoquem danos em florestas, agriculturas e plantas ornamentais. Neste grupo, as pesquisas enfocam principalmente os aspectos ecológicos relacionados ao controle de pragas. Pouco se conhece sobre a estrutura genética de suas populações e os estudos sobre variabilidade genética apontam níveis discordantes dentro do grupo. Neste trabalho, foram estudados alguns aspectos da biologia de *D. diversipes*, um sínfita neotropical com larvas ativas de novembro a março que tem como planta hospedeira *Eugenia glazioviana* (Myrtaceae), onde os aglomerados de casulos são encontrados. A variabilidade genética e a estrutura populacional foram determinadas por análise alozímica em eletroforese em gel de amido. Os agregados foram coletados na Estação Ecológica Jataí, (Luiz Antônio, SP 21°25 S, 47°50 W) nos anos de 2000 e 2001 em duas áreas da reserva. Observações de campo evidenciaram; i) as larvas de *Digelasinus diversipes* se dispersam durante a alimentação, migrando entre as árvores vizinhas; ii) larvas de diferentes posturas se associam para a construção comunal dos aglomerados, observação corroborada pelo baixo valor de parentesco entre os indivíduos do agregado. Os adultos são efêmeros; os machos menores que as fêmeas, que nascem com seus ovos prontos para a fecundação e/ou oviposição. A razão sexual secundária, obtida com indivíduos emergidos em laboratório, é enviesada em favor das fêmeas. As análises eletroforéticas demonstraram heterozigosidade média ( $H_{obs} = 0,094 \pm 0,025EP$ ) elevada para a espécie, diferentemente do que ocorre para outros himenópteros. Não foram observados níveis significativos de endogamia nas amostras estudadas, mas a população mostrou-se estruturada, sugerindo fluxo gênico reduzido como consequência da baixa capacidade de dispersão.

## Abstract

Symphyta is a suborder of Hymenoptera, which presents primitive characters, like absence of constriction at the base of the abdomen. Symphyta larvae are phytophagous and feed gregariously, causing damage to agricultural crops, ornamental plants and forests stands, especially in temperate zones. In this group researches focus mainly on ecological aspects related to pests control. There are few data about population genetic structure, and studies about genetic variability exhibit disagreeable data. This study attempts to elucidate some aspects of the biology of *Digelasinus diversipes*, a Neotropical Symphyta with active larvae from November until March which host in *Eugenia glazioviana* (Myrtaceae) trees, where cocoon masses can be found. Genetic variability and population structure were measured by allozymic analyses through starch gel electrophoresis. Cocoon masses were collected in 2000 and 2001, in two areas of the Estação Ecológica Jataí (Luiz Antônio, SP – 21°25'S, 47°50'W). Field observations evidenced i) *Digelasinus diversipes* larvae disperse during foraging, among neighboring trees; ii) larvae from different ovipositions associate to cocoon mass communal construction, observation corroborated by the low relatedness coefficient among individuals of cocoon mass; iii) adults are short-lived; males are smaller than females, which emerge with all eggs matured for fecundation and/or oviposition; iv) the secondary sex ratio, measured by individuals emerged at laboratory, are female-biased. Electrophoretic analyses reveal high levels of average heterozygosity ( $H_{obs} = 0.094 \pm 0.025SE$ ) for this species, contrasting with previous data for other Hymenopteran species. There were no significant levels of inbreeding inside samples, but the population was structured, suggesting low levels of gene flow, a consequence of their low dispersal ability.

## 1. Introdução

---

Os himenópteros são comumente conhecidos por algumas espécies de vespas, formigas e, principalmente, abelhas. Esta familiaridade decorre da domesticação da abelha melífera e de algumas espécies de abelhas sem ferrão; poucos grupos dentro desta ordem têm recebido tamanha atenção. Hymenoptera é a terceira maior ordem de insetos e seu sucesso é evidenciado pela vasta diversidade de formas. Nesta ordem, são reconhecidas mais de 115.000 espécies (Hanson & Gauld, 1995) e algumas estimativas indicam que este número pode alcançar 300.000 (Goulet & Huber, 1993).

Os insetos desta ordem apresentam, em sua maioria, reprodução por haplodiploidia arrenótoca, onde as fêmeas são diplóides e originadas de ovos fecundados, enquanto que os machos são haplóides e originados de ovos não fecundados. Diferentemente dos insetos diplóides, onde as fêmeas virgens raramente se reproduzem, em Hymenoptera as fêmeas que não se acasalam também podem se reproduzir, mas nesse caso deixam apenas descendentes machos. Alguns himenópteros também podem se reproduzir por partenogênese telítoca, onde apenas fêmeas são produzidas, todas férteis.

A haplodiploidia arrenótoca tem como consequência a assimetria de parentesco entre os indivíduos de uma prole, ou seja, se considerarmos um sistema de acasalamento onde uma fêmea copula com um único macho, as irmãs compartilham em média 75% de seus genes, as mães compartilham em média 50% de seus genes com seus filhos ou filhas, enquanto que irmãs e irmãos compartilham em média 25% de seus genes. Devido a essas assimetrias, podem ocorrer conflitos de interesse no momento da determinação do sexo da prole (Trivers & Hare, 1976), desviando a razão sexual e favorecendo a produção de fêmeas.

Outra consequência deste modo de reprodução é que a fêmea-mãe pode escolher o sexo de sua prole controlando a liberação do esperma armazenado em sua espermateca, no momento da oviposição (Flanders, 1956;



Gauld & Bolton, 1996). Este controle é, na maioria das vezes, influenciado por estímulos externos, como disponibilidade de alimento e competição por acasalamento. Em himenópteros parasitóides tem sido relatado que a razão sexual da prole está associada à quantidade e à qualidade de recursos disponíveis, de modo que ovos fecundados são ovipositados em hospedeiros maiores, enquanto que ovos não fecundados são depositados em hospedeiros menores (Charnov, 1982; King, 1987; Godfray *et al.*, 1994; Gauld & Bolton, 1996; Ode & Heinz, 2002). Acredita-se que, deste modo, o valor adaptativo (fitness) das fêmeas é aumentado, uma vez que fêmeas maiores sobrevivem por mais tempo e produzem maior número de ovos do que fêmeas menores (Gauld & Bolton, 1996).

A haplodiploidia arrenótoca permite, ainda, eliminar os genes recessivos deletérios de uma população, com a seleção natural operando sobre os machos hemizigotos, onde estes alelos são necessariamente expressos (Havron *et al.*, em Gauld & Bolton, 1996). Desta forma, este sistema permite maiores níveis de endogamia na população, sem a consequência da depressão endogâmica (Gauld & Bolton, 1996). A endogamia também leva à produção de machos diplóides, os quais têm sido amplamente utilizados na investigação dos mecanismos genéticos da determinação do sexo nos himenópteros.

Outra característica importante em Hymenoptera é o comportamento social. Este tipo de comportamento é resultante da presença de cooperação e de alguma forma de organização, onde as ações dos indivíduos são coincidentes e coordenadas, ou de alguma forma comunicativas (Wilson, 1971). Entre os himenópteros são encontrados diversos níveis de sistemas sociais, onde o hábito solitário de criação da prole é o mais comum. A diversidade e a complexidade destes sistemas culminam na organização social apresentada pelas formigas, e por alguns grupos de abelhas e vespas. O cuidado maternal é bastante difundido entre estes insetos (Evans & West-Eberhard, 1970; Gauld & Bolton, 1996), sendo mais pronunciado em espécies

que constróem ninhos e apresentam avançados sistemas sociais, como abelhas e vespas sociais, e formigas (Hunt, 1999).

### 1.1 A Subordem Symphyta

A ordem Hymenoptera apresenta-se tradicionalmente dividida em duas subordens: Apocrita e Symphyta. A primeira compreende Aculeata (formigas, abelhas e algumas vespas) e Parasitica (vespas parasitóides). Embora as espécies de Parasitica totalizem cerca de 50% das espécies de Hymenoptera (Hanson & Gauld, 1995; Gauld & Bolton, 1996), conhece-se relativamente pouco sobre este grupo. As espécies de Symphyta (Figura 1), também conhecidas como 'sawflies' e 'woodwasps', constituem um grupo encontrado em todos os continentes (com exceção da Antártida), com cerca de 8.000 espécies, das quais, pelo menos, 3.000 são do hemisfério ocidental (Smith, 1995). Entretanto, apenas algumas espécies são conhecidas no Brasil. Segundo Hanson & Gauld (1995), a subordem Symphyta se subdivide em seis superfamílias (Figura 2):

- Xyeloidea (Xyelidae);
- Tenthredinoidea (Blasticotomidae, Cimbicidae, Diprionidae, Pergidae, Argidae e Tenthredinidae);
- Megalodontoidea (Megalodontidae e Pamphiliidae);
- Cephoidea (Cephidae);
- Siricoidea ou "vespas de madeira" (woodwasps) (Anaxyelidae, Siricidae e Xyphydriidae);
- Orussoidea (Orussidae).

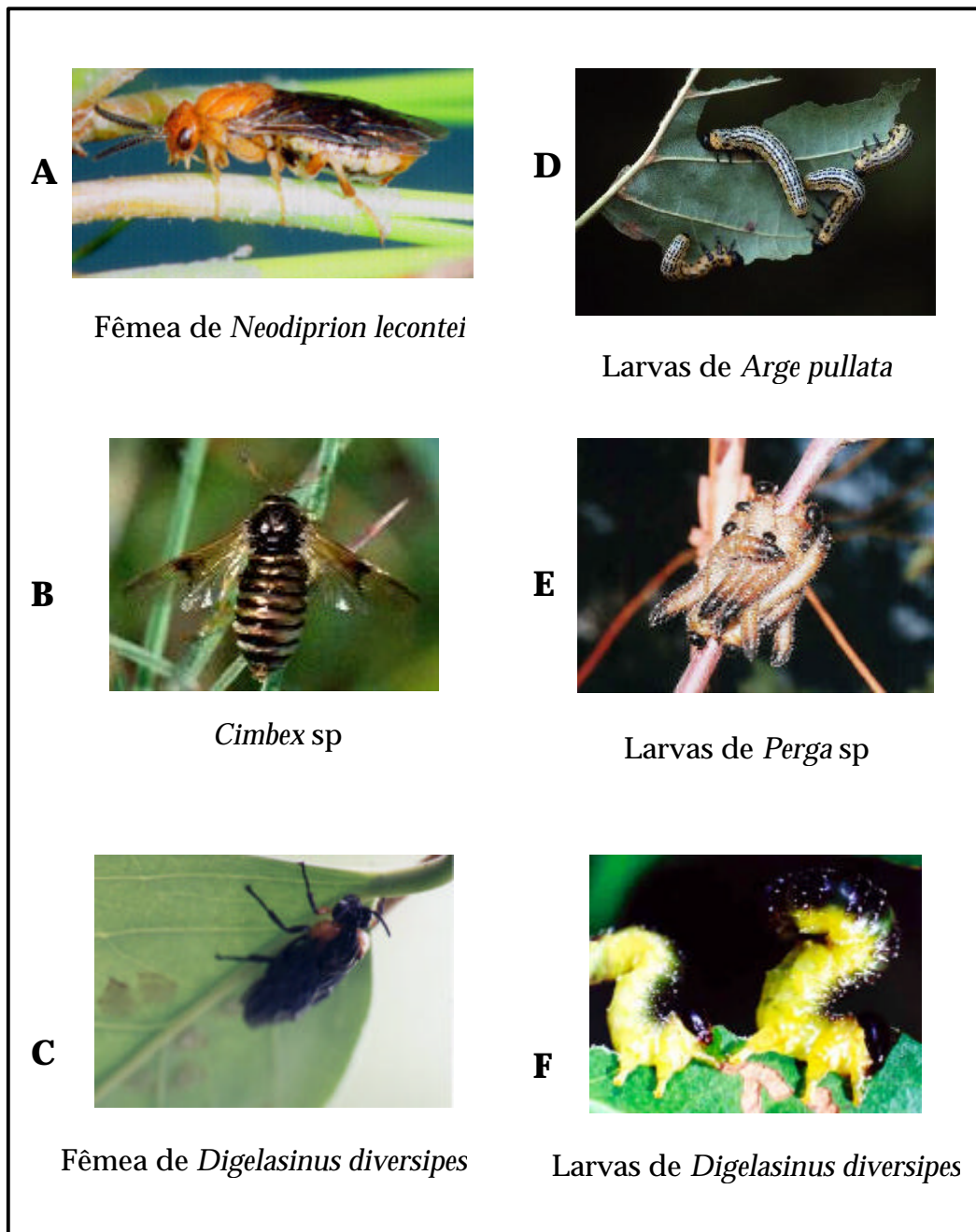


Figura 1: Fotos de Symphyta em diferentes estágios de desenvolvimento. As fotos A, B e C são de exemplares adultos, enquanto que as fotos D, E e F são de exemplares na fase larval, que apresentam comportamento gregário.

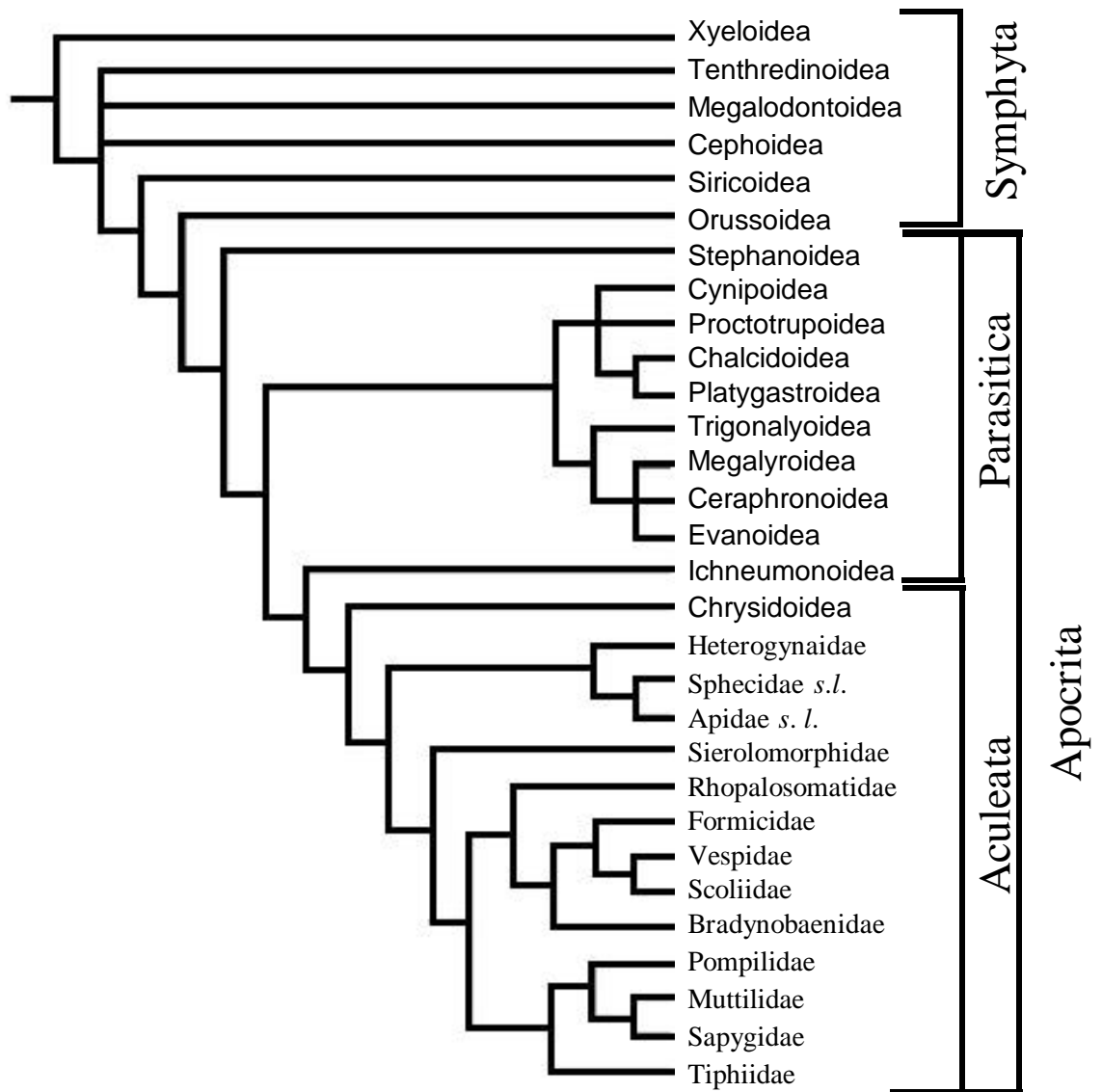


Figura 2: Dendrograma ilustrando a filogenia dentro de Hymenoptera (modificado de Hunt, 1999).

Symphyta é um grupo parafilético, de difícil classificação, onde estão agrupados os representantes estruturalmente mais primitivos de Hymenoptera. Os adultos apresentam ausência de constrição abdominal entre o primeiro e o segundo segmentos, tornando o abdômen largo e relativamente inflexível em relação ao tórax (Daly *et al.*, 1998), diferindo de Apocrita (onde o abdômen apresenta esta constrição, também denominada 'cintura'). Outras características dos adultos são presença de cenchri (exceto em Cephidae), asas com muitas nervuras (exceto em Orussidae), com células fechadas e a presença de uma (ou mais) célula anal na asa anterior. Em sua maioria, não são bons voadores (Mopper *et al.*, 1990; Smith, 1993; Gauld & Bolton, 1996; Östrand & Anderbrant, 2001) e se encontram associados a áreas úmidas (Gauld & Bolton, 1996).

Diferentemente de Apocrita, onde o ovipositor foi modificado em ferrão para defesa ou paralisação das presas, a maioria das fêmeas de sínfita possui o aparelho ovipositor serrilhado (exceto em Siricidae) (Figura 3), característica que dá nome ao grupo (sawfly), podendo ser chamado de 'moscas-de-serra' (Marques, 1933; Costa Lima, 1960) ou de 'vespa-de-serra' (Dias, 1975). Este aparelho é utilizado para fazer pequenos cortes nas folhas onde os ovos serão depositados isoladamente ou em grupos.

As larvas de Symphyta são primariamente fitófagas (exceto em Orussidae), resgatando a ancestralidade do grupo e se alimentam expostas na vegetação ou parcialmente camufladas pelas folhas. São eruciformes (Figura 4), semelhantes às lagartas de Lepidoptera e apresentam pernas abdominais, porém, não possuem ganchos, sendo chamadas por esta razão de 'falsas-lagartas' (Monte, 1946). As larvas passam por 5 ou 6 estágios e os machos geralmente apresentam um estágio larval a menos que as fêmeas. As espécies podem apresentar uma ou mais gerações por ano (univoltismo, bivoltismo ou multivoltismo), podendo ou não entrar em diapausa na fase de pré-pupa.

Em algumas espécies, os grupos larvais são chamados de 'comunidades primitivas' (Lindauer, 1965 em Dias, 1981), uma vez que se

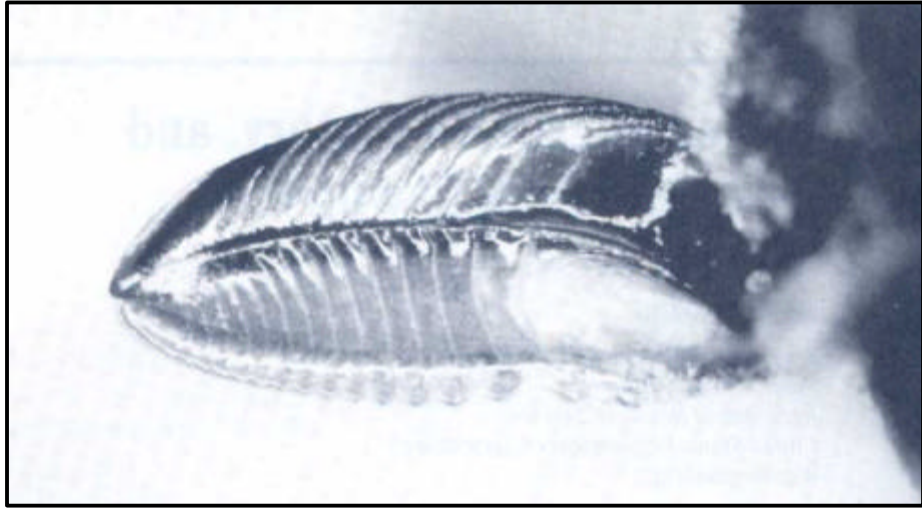


Figura 3: Foto de ovipositor serrilhado de *Arge* sp (Argidae). Este tipo de ovipositor é característico de Symphyta.

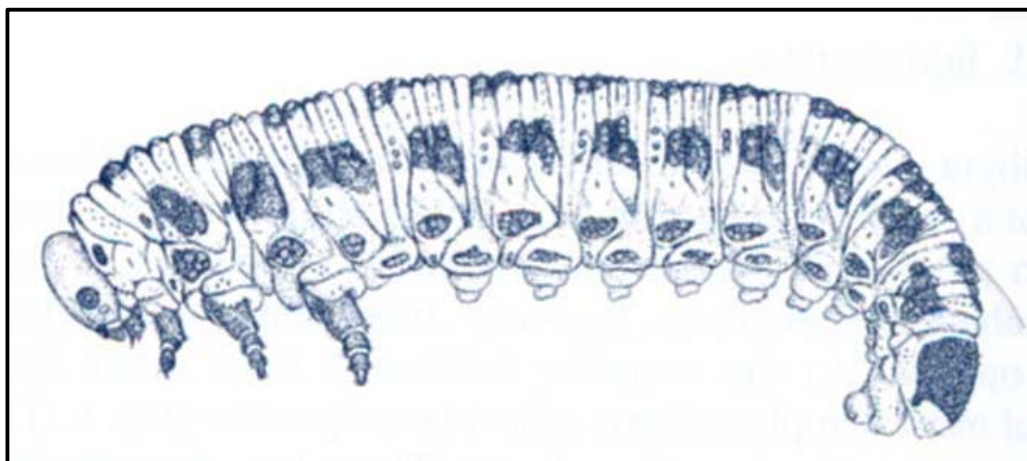


Figura 4: Desenho de larva eruciforme de *Neodiprion lecontei* (Diprionidae), mostrando sua semelhança morfológica com as lagartas de Lepidoptera .

alimentam de maneira gregária. As espécies neotropicais *Themos olfersii* e *Dielocerus diasi* provavelmente estão entre os representantes mais socializados destas comunidades, devido não somente ao comportamento gregário das larvas, mas também porque apresentam sobreposição de gerações, cuidado maternal de ovos e larvas jovens e, no caso de *D. diasi*, porque empupam juntos sobre uma capa tecida comunalmente (Dias, 1981).

Muitas espécies são consideradas de importância econômica, uma vez que as larvas se alimentam em plantas de importância para o homem, causando danos em agriculturas, plantas ornamentais e em florestas de coníferas (Smith, 1993). A maioria das espécies que apresentam gregarismo larval se alimenta de plantas lenhosas e, portanto, são reconhecidas como as mais importantes economicamente (Smith, 1993). As plantas hospedeiras de Symphyta são mais primitivas que as de Lepidoptera, seus relativos ecológicos, o que pode ser explicado pela co-evolução entre os sínfitas primitivos e os grupos mais primitivos de plantas (Heitland & Pschorn-Walcher, 1993).

A maioria das espécies que apresenta o ovipositor serrilhado é altamente específica a seus hospedeiros, alimentando-se de plantas de apenas um gênero (monófagas) e esta especificidade é mais pronunciada em Diprionidae e Argidae, e menos freqüente nas subfamílias de Tenthredinidae (Heitland & Pschorn-Walcher, 1993).

### 1.1.1 Superfamília Tenthredinoidea

Os fósseis deste grupo apareceram no período Jurássico, representado pela extinta família Xyletomidae. Segundo Rasnitsyn (1980, em Gauld & Bolton, 1996) esta família é ancestral a todos os outros tenthredinóideos, dando origem às linhagens Blasticotomidae, Argidae + Pergidae + Electrocomidae e Diprionidae + Cimbicidae + Tenthredinidae. Tenthredinoidea é caracterizado pela tendência das larvas se alimentarem em lugares expostos e de maneira exofítica. Provavelmente, este foi o grupo de insetos fitófagos mais representativos durante o Paleoceno e o Eoceno (Gauld & Bolton, 1996).



Tenthredinoidea é considerada a maior superfamília dentro de Symphyta e, como relatado anteriormente, é constituída de seis famílias: Blasticotomidae, Cimbicidae, Diprionidae, Pergidae, Tenthredinidae e Argidae, sendo as duas últimas de maior diversidade na região tropical.

De maneira geral, as espécies desta superfamília são univoltinas. Os machos emergem primeiro que as fêmeas, as quais emergem com todos seus ovos prontos para serem fecundados e/ou ovipositados. A cópula se dá logo após o nascimento. Os ovos são depositados com o auxílio do aparelho ovipositor serrilhado e ficam incubados por volta de duas semanas, absorvendo água do tecido foliar. Deste modo, os ovos aumentam muitas vezes de tamanho e acabam rompendo o tecido (Dias, 1981).

Argidae é a segunda maior família de Symphyta, agrupando cerca de 800 espécies (aproximadamente 10% das espécies conhecidas de Symphyta), divididas em 6 subfamílias e com 51 gêneros. A grande maioria das espécies é neotropical (360 espécies de 32 gêneros e 5 subfamílias, segundo Smith, 1992). Os representantes de Argidae não apresentam o impacto econômico que as espécies de Tenthredinidae e Pergidae possuem, mas são de grande importância local como desfoliadores (Knerer, 1993). As espécies desta família se alimentam em angiosperma, arbustos e plantas herbáceas, exceto *Zenarge* (australiano) que é associado a coníferas.

#### 1.1.2 Estudos realizados com sínfitas Brasileiros

De maneira geral, os sínfitas neotropicais têm sua biologia pouco conhecida (Smith 1995). No Brasil, poucos são os trabalhos nesta área, sendo que apenas duas espécies foram estudadas em detalhes, *Themos olfersii* e *Dielocerus diasi* (Dias, 1975 e 1976) ambas pertencentes a Argidae. Alguns aspectos ecológicos de *D. diasi* (como a distribuição espacial desta espécie e de seu hospedeiro) foram abordados por Emery (1998).

*T. olfersii* é uma espécie bivoltina, que tem como planta hospedeira *Eriotheca pubescens* (Bombacacea). Os adultos emergem durante o período das

chuvas (a primeira geração ocorre de Outubro a Março, enquanto que a segunda geração ocorre de Janeiro a Dezembro). *D. diasi*, por sua vez, é uma espécie encontrada o ano todo (multivoltina) e tem como planta hospedeira *Sclerobium aureum* (Leguminosae). A duração média do ciclo de vida desta espécie é de 90 dias (exceto nos casos de diapausa), com um máximo de quatro gerações por ano, sendo que estes ciclos não estão necessariamente sincronizados em diferentes populações.

As fêmeas das duas espécies emergem com seus ovos prontos para serem fecundados e/ou ovipositados e realizam a postura de uma só vez, sobre uma única folha. O número de ovos e o tempo de desenvolvimento variam de acordo com a espécie. Em *D. diasi*, por exemplo, cada fêmea coloca em média 75 ovos e o tempo de desenvolvimento é de 14 dias, enquanto que em *T. olfersii* cada fêmea coloca apenas 27 ovos em média e este tempo é de 23 dias. Esta variação reflete no tamanho das larvas recém-nascidas (as de *T. olfersii* têm o dobro do tamanho das de *D. diasi*) e provavelmente está relacionada ao grau de especialização do comportamento maternal (Dias, 1975 e 1976): as fêmeas das duas espécies não descuidam de sua prole e apresentam uma série de comportamentos defensivos, protegendo principalmente os ovos e as larvas mais jovens.

As larvas destas duas espécies apresentam gregarismo acentuado, permanecendo juntas desde o momento da eclosão até se encasularem. Os casulos de *T. olfersii* são delgados, moles e revestidos de grãos de terra, enquanto que os casulos de *D. diasi* são duros e muito espessos, colados lateralmente uns aos outros. Estes casulos apresentam ainda uma cobertura espessa de seda, denominada 'esponja', e finalmente uma outra cobertura de seda branca, fina e contínua, denominada 'capa' (Dias, 1975 e 1976).

*Digelasinus diversipes* (Figura 5), objeto de estudo do presente trabalho, tem sua biologia pouco conhecida. Segundo Pentead-Dias (1991), as larvas desta espécie constróem seus aglomerados de casulos de forma desordenada, paralelos ou perpendiculares uns aos outros, e envoltos por uma

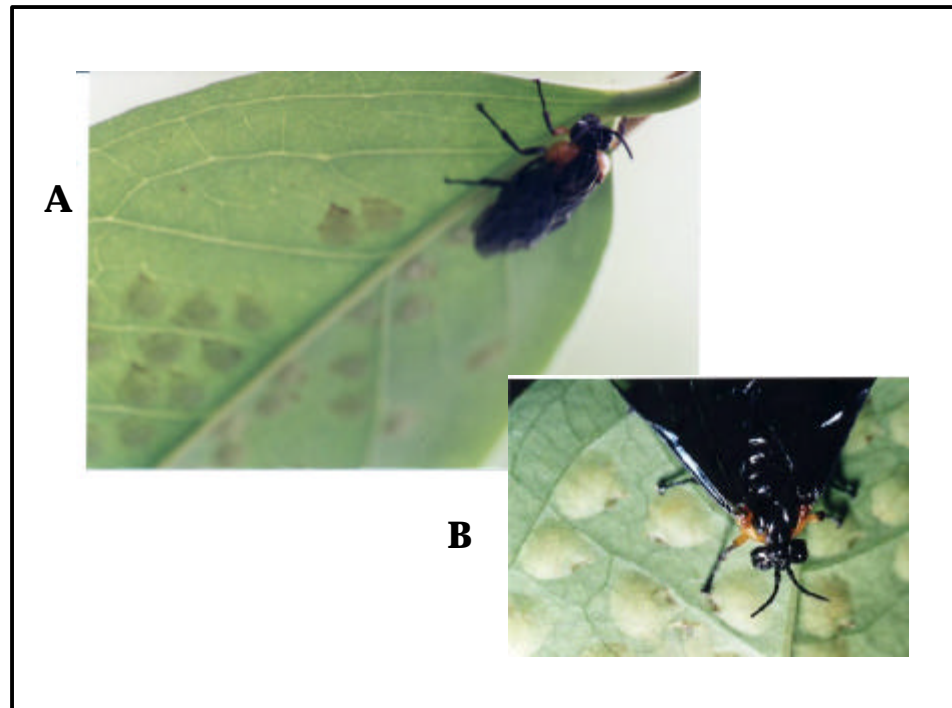


Figura 5: Fêmea de *Digelasinus diversipes* realizando postura em folha de *Eugenia glazioviana* (A). Em (B) a fêmea caminha sobre sua oviposição.

capa de seda marrom. Estes aglomerados variam de tamanho, ou seja, variam no número de casulos que possuem e são constituídos de material hidrófilo, não oferecendo proteção durante a época das chuvas. A seda que recobre o agregado de casulos é constituída principalmente de alanina, glicina e serina (Craig *et al.*, 1999). As larvas estão ativas de Novembro a Março, enquanto que os adultos apresentam uma geração por ano (univoltismo), podendo ou não entrar em diapausa, e são encontrados a partir do início de Outubro (Penteado-Dias, 1991). *D. diversipes* é parasitado por *Lymeon dieloceri* (Ichneumonidae) (Costa Lima, 1937), *Perilampus* sp (Perilampidae) e *Spilochalcis* sp (Chalcididae) (Penteado-Dias, 1991).

## 1.2 Genética de Populações de Symphyta

O desenvolvimento da técnica eletroforética por Smithies em 1955, juntamente com os procedimentos de coloração histoquímica de Hunter & Markert em 1957, tornou possível estudar a variabilidade genética existente em populações naturais (Avice, 1974). Desde então, esta técnica tem sido amplamente utilizada para quantificar a variação genética e verificar a organização desta variação em plantas e animais (Lester & Selander, 1979).

Os estudos de genética evolutiva em Hymenoptera através deste tipo de análise têm evidenciado um baixo grau de polimorfismo nesta ordem em comparação a outros insetos (Snyder, 1975; Metcalf *et al.*, 1975; Pamilo *et al.*, 1978; Lester & Selander, 1979; Berkelhamer, 1983; Graur, 1985; Crespi, 1991; Packer & Owen, 2001).

As justificativas para estes baixos índices de heterozigosidade estão baseadas na haplodiploidia e nas características comportamentais e ecológicas dos himenópteros (Rosenmeier & Packer, 1993). A haplodiploidia (fêmeas são diplóides e machos são haplóides) leva à redução do tamanho efetivo da população, aumenta a taxa de fixação dos alelos e dificulta a obtenção de um polimorfismo estável (Crozier, 1970; Lester & Selander, 1979; Pamilo & Crozier, 1981; Avery, 1984; Owen, 1985). De modo semelhante, a

eusocialidade também promove a redução do tamanho efetivo da população, uma vez que poucos indivíduos são responsáveis pela reprodução (Pamilo *et al.*, 1987; Lester & Selander, 1979; Berkelhamer, 1983). Ainda, segundo a hipótese da variação de nicho (Van Valen, 1965), quanto mais variável for o ambiente, maior será a heterozigosidade. Assim, em colônias de insetos sociais ou eusociais o ambiente está tamponado, o que resulta em menor variabilidade. A variabilidade também é menor em espécies parasitas, que freqüentemente experimentam o afunilamento em suas populações devido a mudanças na quantidade de hospedeiros (Lester & Selander, 1979).

É consenso que insetos haplodiplóides (Hymenoptera) apresentam menor variabilidade genética do que insetos diplóides, porém os dados se mostram contraditórios quanto ao grau de socialidade e os níveis de heterozigosidade presentes nesta ordem (Berkelhamer, 1983; Owen, 1985; Reeve *et al.*, 1985; Shoemaker *et al.*, 1992; Rosenmeier & Packer, 1993; Hedrick & Parker, 1997; Packer & Owen, 1990; Packer & Owen, 2001).

Embora a maioria dos estudos sobre variabilidade genética dentro dos himenópteros tenha sido conduzida em espécies sociais ou parasitóides da subordem Apocrita, os poucos estudos realizados em Symphyta (que agrupa espécies não sociais) mostram níveis discordantes de heterozigosidade, verificando-se ora valores baixos como os de Hymenoptera, ora valores elevados como os encontrados para insetos diplóides.

Estudando polimorfismos enzimáticos em três espécies de Symphyta, *Euura s-nodus* e *Euura* n. sp (Tenthredinidae) e *Schizocerella pilicornis* (Argidae), Sheppard & Heydon (1986) encontraram níveis de heterozigosidade semelhantes aos observados em insetos diplóides. Os valores de heterozigosidade para *E. s-nodus*, *Euura* n. sp e *S. pilicornis* foram de 0,137, 0,124 e 0,166, respectivamente, sendo consideravelmente superior à observada para outros himenópteros (0,036).

Boato & Battisti (1995) também encontraram altos índices de heterozigosidade ao estudarem espécies de *Cephalcia*. O menor valor de

heterozigosidade encontrado foi de 0,063 para *C. erythrogaster*, porém apenas uma população desta espécie foi analisada, e este pode ter sido subestimado. Para as espécies *C. abietis*, *C. alashanica*, *C. arvensis*, *C. falleni*, *C. fulva* e *C. klugii*, os valores de heterozigosidade variaram de 0,138 até 0,286, mesmo quando poucos indivíduos foram analisados. A heterozigosidade média encontrada para as espécies de *Cephalcia* (0,197) foi significativamente maior do que a encontrada para os outros Symphyta da família Tenthredinidae (0,059).

O estudo de Rosenmeier & Packer (1993) em *Neodiprion pratti* e *N. maurus* (Symphyta; Diprionidae) e *Halictus confusus* e *H. tumulorum* (Apocrita; Halictidae), constatou uma baixa heterozigosidade média (0,048) para as espécies de *Neodiprion*, um índice que não difere significativamente do encontrado para *Halictus*. Porém, ao recalcularem a heterozigosidade média para Symphyta, o valor encontrado (0,070) reafirmou a maior variabilidade de Symphyta em relação aos demais himenópteros.

De modo semelhante Woods & Guttman (1987), ao estudarem *Diprion similis* e 13 espécies de *Neodiprion*, incluindo *N. pratti* e *N. maurus*, estimaram uma heterozigosidade média próxima a 0,060, valor não estatisticamente distinto do observado para Hymenoptera (0,039). Apoiando estes resultados, Beaudoin *et al.* (1997) constataram em *Diprion pini* L (Diprionidae) baixos níveis de polimorfismo enzimático.

Além da descrição da variação populacional em espécies de sínfitas, a eletroforese de proteínas foi utilizada também para caracterizar 13 espécies de *Neodiprion* de difícil identificação, principalmente *N. swaini*, *N. rugifrons* e *N. dubiosus*, cujos machos não apresentavam diferenças morfológicas (Kuenzi & Coppel, 1986). De forma semelhante, Beaudoin *et al.* (1997) utilizaram desta técnica para melhor caracterizar 6 populações de *Diprion pini* que apresentam voltismos distintos.

### 3. Material e Métodos

---

#### 3.1 Material

Aglomerados de casulos de *D. diversipes* foram coletados em duas áreas da Estação Ecológica Jataí (Luís Antônio, SP – 21°25'S, 47°50'W), denominadas Lagoa do Pato (Pat) e Lagoa do Infernã (Inf), distantes 1,7 Km entre si. Foram amostrados 67 agregados, 31 no período de agosto a outubro de 2000 e 36 em setembro de 2001, presos ao tronco de *Eugenia* cf. *glazioviana* Kiaersk. (Myrtaceae), próximos ao solo. Os agregados foram retirados do tronco das árvores, individualizados, levados ao laboratório, dispostos em caixas plásticas mantidas à temperatura ambiente. Durante todo o período do experimento, os casulos foram mantidos úmidos por borrifamento de água. Após emergirem, os adultos foram armazenados em freezer a -20°C até o momento das análises.

#### 3.2 Métodos

##### 3.2.1 Biologia de *Digelasinus diversipes*

De dezembro de 2001 a março de 2002, foram realizadas observações (aproximadamente 80 horas) do comportamento das larvas e adultos presentes na Lagoa do Infernã. As plantas hospedeiras estavam espalhadas em um trecho de 150m, à beira de um alagado. Foram verificados: (i) a forma de alimentação das larvas, (ii) a possível ocorrência de recrutamento entre elas, (iii) o período de maior atividade de larvas e adultos, (iv) o comportamento de oviposição e (v) existência de cuidado maternal nesta espécie. Algumas larvas foram marcadas com tinta à base de nitrocelulose de diferentes cores para verificar a possível fusão dos grupos de alimentação e os padrões de dispersão destes grupos na árvore hospedeira. Também foi anotada a presença de inimigos naturais na área de observação. Durante a coleta de 2001, as árvores hospedeiras foram medidas, anotando-se então a circunferência na base do tronco destas árvores e a altura do agregado ao solo.

O ciclo de desenvolvimento foi determinado com base nas observações feitas no campo sobre o aparecimento dos adultos e a construção dos aglomerados pelas larvas e pelas observações no laboratório sobre a emergência dos adultos.

Os adultos emergidos no laboratório foram sexados e pesados em balança de precisão (0,1mg). As diferenças entre o peso de indivíduos emergidos de diferentes agregados foram testadas através de ANOVA e as possíveis diferenças entre a média de peso de machos e fêmeas das quatro amostras foram testadas através de teste -t, utilizando o programa InStat3.

A razão sexual secundária foi calculada a partir de adultos emergidos no laboratório durante os dois anos de estudo, como sendo a razão do número de fêmeas / número de machos para cada agregado e para a população como um todo. As possíveis relações entre o tamanho do agregado e a razão sexual, bem como o tamanho do agregado e o peso médio dos indivíduos emergidos, foram testadas por correlação de Pearson (para dados que passaram pelo teste de normalidade) e por correlação de Spearman (para dados que não passaram pelo teste de normalidade), utilizando o programa InStat3.

Com o propósito de determinar se a fecundidade das fêmeas estaria relacionada ao seu tamanho, ou seja, se fêmeas maiores seriam potencialmente mais fecundas que fêmeas menores, 19 fêmeas escolhidas ao acaso foram pesadas e dissecadas. Seus ovos foram contados e foi estabelecida uma relação entre o peso da fêmea e o número de ovos, através de regressão Modelo II (Sokal & Rohlf, 1995).

A relação entre o tamanho da planta hospedeira e o tamanho dos agregados foi averiguada através de correlação entre a medida da circunferência na base do tronco de cada árvore hospedeira e o tamanho do agregado. Como a maioria dos aglomerados tinha forma semelhante à de uma elipse, sua área (determinada usando-se a fórmula para cálculo da área dessa figura geométrica) foi utilizada como indicativo do número de casulos.



Adotando-se este procedimento, evitou-se que os agregados fossem danificados e que larvas ainda em diapausa fossem mortas. Para estimar o número médio de casulos de um agregado, 16 agregados tiveram o número de células contadas e as medidas das áreas tomadas; assim, através de uma regressão linear, estimou-se o número de células dos outros agregados, dos quais apenas as medidas haviam sido tomadas.

### 3.2.2 Análise aloenzimática

Dos 67 agregados coletados, 38 foram utilizados nas análises eletroforéticas, sendo 13 deles coletados em 2000 (11 de Pat00 e 2 de Inf00) e 25 deles coletados em 2001 (16 de Pat01 e 9 de Inf01). Vários testes foram realizados com indivíduos inteiros ou sem o abdômen para que se obtivesse a melhor resolução eletroforética dos padrões enzimáticos. Os machos foram macerados em 0,15 mL de solução aquosa de 2-mercaptoetanol 0,2%, enquanto que as fêmeas foram maceradas em 0,3 mL desta solução, com exceção dos géis confeccionados em tampão histidina pH 6.0 para revelação da Est-4, onde o volume final da solução foi de 0,3mL para os machos e 0,8mL para as fêmeas. As amostras foram maceradas com o auxílio de um bastão de vidro, centrifugadas a 8.000 rpm durante 10 minutos e os sobrenadantes obtidos foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de amido 14% (Penetrose 30<sup>TM</sup>), de acordo com a técnica de Smithies (1955). Foram analisados 23 sistemas enzimáticos, correspondentes a 38 locos gênicos. Os sistemas enzimáticos estudados e o número de locos correspondentes, bem como os tampões e condições de corrida utilizados estão apresentados na Tabela 1.

A detecção da atividade esterásica foi realizada com a utilização de substratos fluorogênicos (derivados de 4-metilumbeliferona) e ésteres de  $\alpha$ -naftol, de acordo com procedimentos descritos por Hopkinson *et al.* (1973). As misturas de reação para a detecção de atividade das demais enzimas foram preparadas segundo Harris e Hopkinson (1976), e vertidas sobre o gel, o qual permaneceu incubado a 37° até que as regiões de atividade fossem reveladas.

Tabela 1. Sistemas enzimáticos, número de locos estudados, entre parênteses o número de locos polimórficos, sistema tampão de confecção do gel, e condições de corrida onde foram feitas as análises eletroforéticas de *Digelasinus diversipes*.

Sistemas enzimáticos	Nº Locos	Tampão
$\beta$ -hidroxibutirato desidrogenase - $\beta$ -Hbdh	1 (0)	C
fumarase – Fum	1 (0)	C
manose 6-fosfato isomerase – Mpi	1 (1)	C
glicose 6-fosfato desidrogenase – G6pd	1 (0)	C
$\alpha$ -glicerofosfato desidrogenase - $\alpha$ -Gpdh		
6-fosfogluconato desidrogenase – 6Pgd	1 (0)	D
isocitrato desidrogenase – Icd	1 (1)	D
enzima málica – Me	3 (1)	D
malato desidrogenase – Mdh	2 (1)	E
superóxido dismutase – Sod	6 (4)	A
esterases – Est	3 (2)	A
fosfatase ácida – Acp	1 (0)	A
leucil aminopeptidase – Lap	3 (3)	B
peptidases A, B e D – Pep	2 (0)	B
diaforases – Dia	1 (0)	A
aconitase – Acon	1 (0)	A
fosfoglicose isomerase – Gpi	1 (1)	E
fosfoglucomutase – Pgm	1 (0)	E
hexoquinase – Hk	1 (0)	B
arginina quinase – ArgK	1 (0)	E
transaminase glutâmica oxaloacética – Got	1 (0)	C
aldolase – Ald	1 (0)	C
adenilato quinase – Ak	1 (0)	C

A - Tris-citrate pH 7.5 (55mA / 5h30min)

B - Tris-citrate-borate pH 8.0-8.0 (32mA / 4h)

C - Tris-citrate pH 8.0 (50mA / 5h)

D - Tris-histidine pH 6.0-6.6 (55mA / 5h30min)

E - Tris-EDTA-maleate-magnesium pH 7.4 (85mA / 5h30min)

### 3.2.2.1 Análise dos dados

Os marcadores genéticos forneceram os fenótipos e suas respectivas frequências, com as quais foi possível estimar os parâmetros de diversidade genética em *D. diversipes*: grau de polimorfismo genético (P) nesta espécie, número médio de alelos por loco (A), heterozigosidade intraloco ( $H_i$ ) e heterozigosidade média observada ( $H_{obs}$ ) e esperada ( $H_{esp}$ ).

As frequências gênicas foram estimadas por contagem direta. A verificação de equilíbrio genético foi realizada através de teste de aderência a um nível de significância de 5% entre frequências genotípicas observadas e esperadas. A variação genética foi determinada pela heterozigosidade intraloco e pela heterozigosidade média observada e esperada e seu respectivo erro-padrão (Nei & Roychoudhury, 1974) para cada amostra e para a amostra total. As comparações entre as heterozigosidades foram realizadas utilizando o método Bootstrap sobre locos (Efron, 1982), com 200 repetições e intervalo de confiança de 95%.

A diferenciação genética dentro e entre as amostras foi analisada através dos coeficientes da estatística-F de Wright ( $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  e  $F_{IT}$ ), e pelas distâncias genéticas segundo Cavalli-Sforza & Edwards (1967) e Nei (1972, 1978), obtidos pelo programa BYOSIS-1 (Swofford & Selander, 1981). Estas relações de similaridade genética foram representadas por dendrogramas segundo as análises de agrupamentos obtidas pela técnica do UPGMA (Swofford e Selander, 1981).

O valor médio do parentesco genético entre os indivíduos dos agregados e o respectivo erro-padrão foi estimado pelo programa RELATEDNESS 4.2b (Queller & Goodnight, 1989).

## 4. Resultados

---

### 4.1 Biologia de *Digelasinus diversipes*

#### 4.1.1 Ciclo de vida

O ciclo de vida de *Digelasinus diversipes* pode ser visto na Figura 6. Esta espécie apresentou apenas uma geração a cada ano (univoltina) e suas larvas podem ou não permanecer em diapausa, como pré-pupas. No laboratório, adultos de agregados coletados em 2000 permaneceram em diapausa e emergiram um ano depois, juntamente com os adultos dos agregados coletados em 2001. Em agosto de 2001, quando já não havia mais emergência de indivíduos dos agregados de 2000, com o auxílio de estilete, abrimos os casulos de alguns agregados e pudemos verificar, em muitos casos, larvas ainda vivas, em diapausa.

O período de emergência compreendeu os meses de outubro a janeiro, sendo que o maior número de nascimentos foi observado em dezembro (Figura 7). Os adultos emergiram nas horas mais quentes da manhã, com o pico de eclosão por volta das 11 horas. Os primeiros adultos a emergir dos casulos usualmente foram machos (Figuras 8 e 9). Os adultos de *Digelasinus diversipes* parecem apresentar vida efêmera, em média, dois dias.

Os agregados coletados durante o período de agosto e setembro de 2000 tiveram sua cobertura de seda removida na tentativa de identificar de quais casulos emergiam machos e fêmeas. Neste ano, o período de emergência no laboratório teve início em setembro de 2000, prolongando-se até maio de 2001. Emergiram 1102 indivíduos (de todos os agregados amostrados), sendo 765 fêmeas e 337 machos (Tabela 2), com o pico máximo de nascimentos em dezembro, mês em que nasceram, aproximadamente, 54% dos indivíduos (Figura 7).

A cobertura de seda dos agregados coletados em agosto de 2001 não foi retirada, uma vez que o objetivo inicial de marcar de quais casulos



Figura 6: Ciclo de vida de *Digelasinus diversipes*. Por volta de um mês após a oviposição as larvas eclodem e se alimentam durante cinco meses. Então migram pelo caule da planta até bem próximo ao solo para encasular. As larvas podem ou não entrar em diapausa.

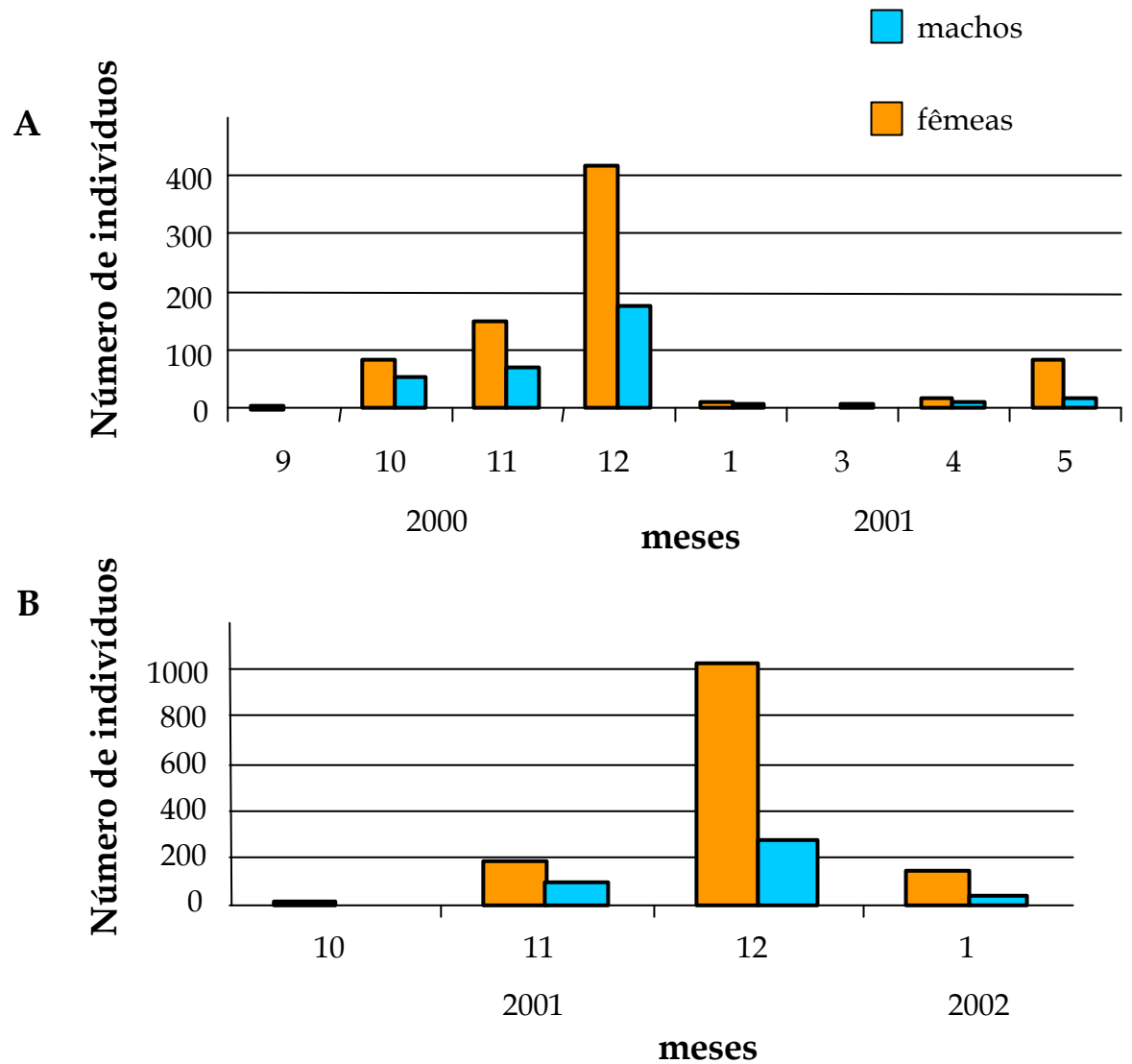


Figura 7: Emergência de machos e fêmeas de *Digelasinus diversipes*. Em (A) emergência de indivíduos de agregados coletados em 2000, e em (B) emergência de indivíduos de agregados coletados em 2001.

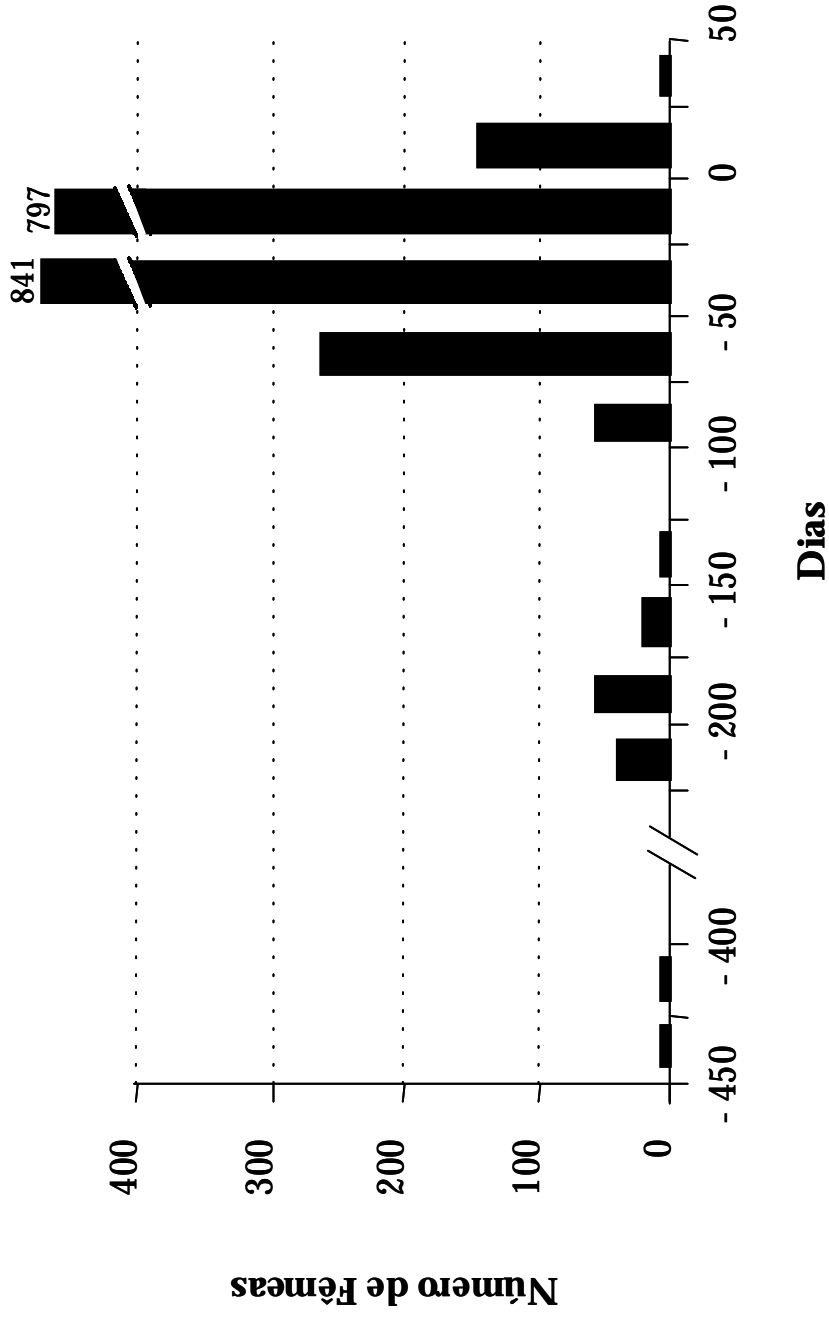


Figura 8: Emergência dos indivíduos nascidos em laboratório, dos agregados coletados nas duas áreas de estudo, nos dois anos consecutivos. O dia Zero corresponde ao dia em que o primeiro macho emergiu, os números positivos correspondem as fêmeas que emergiram antes deste dia, enquanto que os números negativos correspondem as fêmeas que emergiram depois deste dia.

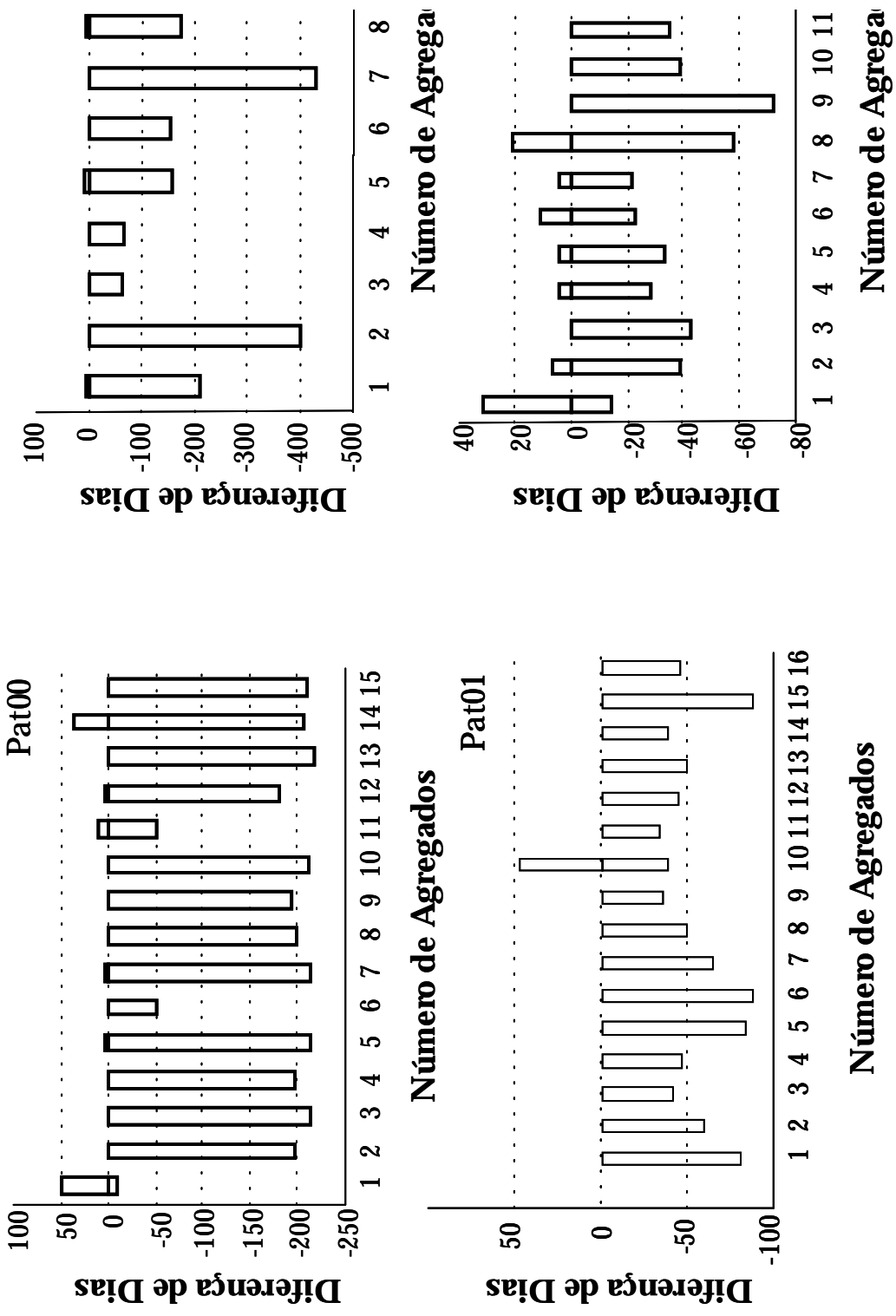


Figura 9: Emergência das fêmeas em relação ao primeiro macho (dia Zero) em cada agregado. Os números positivos correspondem à fêmea que emergiu antes do primeiro macho, enquanto que os números negativos correspondem à última fêmea que emergiu depois do primeiro macho.



Tabela 2. Total de adultos de *Digelasinus diversipes* emergidos em laboratório entre setembro de 2000 e janeiro de 2002.

Período de Emergência		Número de indivíduos		
ano	meses	Fêmeas	Machos	Total
1ª coleta				
2000	9	2	1	3
	10	80	54	134
	11	148	72	220
	12	420	174	594
2001	1	13	6	19
	3	1	4	5
	4	18	11	29
	5	83	15	98
Total		765	337	1102
2ª coleta				
2001	10	17	5	22
	11	183	96	279
	12	1029	276	1305
2002	1	146	38	184
Total		1375	415	1790
Total Geral		2140	752	2892

emergiam machos e fêmeas não foi atingido. Neste segundo ano, o período de emergência no laboratório teve início em outubro de 2001, prolongando-se até janeiro de 2002. Neste período, emergiram 1790 indivíduos (de um agregado de Pat01 e três de Inf01 não ocorreram emergências), sendo 1375 fêmeas e 415 machos (Tabela 2), com o pico de nascimentos em dezembro, onde nasceram, aproximadamente, 73% dos indivíduos (Figura 7).

Foi constatada a presença de parasitas associados aos agregados, os quais emergiram no laboratório. Espécimes (n = 100) de *Lymeon dieloceri* (Costa Lima, 1937), *Perilampus* sp., *Conura* (*Spilochalcis*) sp. (Hymenoptera: Ichneumonidae, Perilampidae e Chalcididae) foram observados e suas frequências relativas estão representadas na Figura 10.

Os adultos apresentaram marcante dimorfismo sexual em relação ao tamanho do corpo, sendo os machos menores que as fêmeas. Dos agregados coletados em 2000, foram pesados 544 indivíduos recém emergidos, sendo 312 (204 fêmeas e 108 machos) de Pat00 e 232 (164 fêmeas e 68 machos) de Inf00. Os machos de Pat00 apresentaram peso médio de  $53 \pm 8$  mg e as fêmeas apresentaram peso médio de  $160 \pm 25$  mg. Os machos de Inf00 apresentaram peso médio de  $55 \pm 8$  mg, enquanto que as fêmeas pesaram em média  $166 \pm 28$  mg. Dos agregados de 2001/2002, foram pesados 762 indivíduos recém emergidos, sendo 589 (442 fêmeas e 147 machos) de Pat01 e 173 (123 fêmeas e 50 machos) de Inf01. Os machos de Pat01 apresentaram peso médio de  $44 \pm 7$  mg e as fêmeas apresentaram peso médio de  $123 \pm 24$  mg. Os machos de Inf01 apresentaram peso médio de  $57 \pm 11$  mg, enquanto que as fêmeas pesaram em média  $160 \pm 33$  mg. As diferenças entre os pesos de machos e fêmeas entre os dois anos são significativas ( $p < 0,0001$ ; IC 95%), assim como as diferenças entre os pesos de machos e fêmeas nas amostras analisadas ( $p < 0,0001$ ; IC 95%).

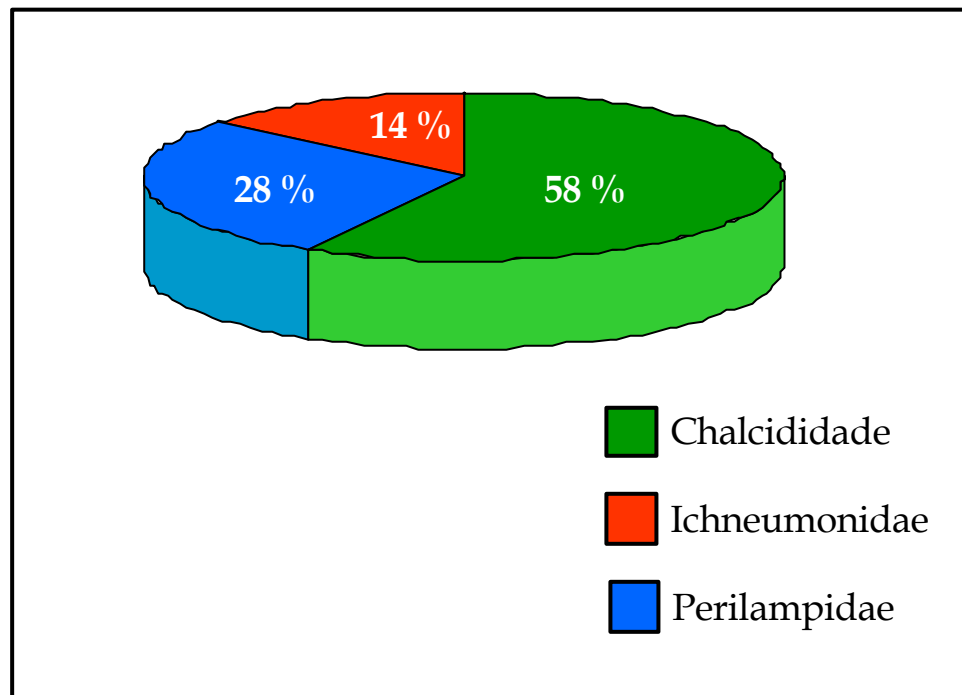


Figura 10: Porcentagem de parasitas associados ( $n = 100$ ) aos agregados de *Digelasinus diversipes*, emergidos no laboratório.

#### 4.1.2 Razão Sexual

A razão sexual secundária foi calculada a partir de 2892 indivíduos emergidos no laboratório, de 63 agregados diferentes. Deste total, 2140 eram fêmeas e 752 eram machos. Apenas 7 destes agregados apresentaram emergência de apenas um sexo (de 3 agregados emergiram apenas fêmeas e de 4 agregados emergiram apenas machos); destes sete agregados, um número muito baixo de indivíduos emergiram.

O número de indivíduos emergidos de cada um dos agregados, bem como as razões sexuais encontradas para cada um deles estão sumariados nas Tabelas 3 e 4, para as amostras coletadas em 2000 e em 2001. Nestas tabelas, estão descritos apenas os agregados de onde emergiram 10 ou mais indivíduos.

Os valores de razão sexual secundária encontrados diferem da proporção 1:1 (fêmeas : machos), com a razão desviada para fêmeas. Foram feitos testes de aderência ( $\alpha = 0,05$  e  $\alpha = 0,10$ ) para verificar razão sexual de 2:1, 3:1 e 4:1. A razão sexual encontrada deve estar, para a maioria dos agregados, entre 2:1 e 3:1 a favor de fêmeas. As Tabelas 3 e 4 trazem qual a razão sexual possível para cada agregado. Nenhum agregado apresentou razão sexual 4:1.

#### 4.1.3 Cópula, Oviposição e Cuidado Maternal

Após a emergência, os adultos liberam uma substância líquida de odor desagradável. Tal substância também é liberada quando são perturbados, como, por exemplo, quando são manuseados com a pinça. Ao serem perturbados, os adultos ficam imóveis como se estivessem mortos. No laboratório foi observado que machos e fêmeas, logo após emergirem, procuram copular entre si. Um macho pode copular com mais de uma fêmea, porém não foi possível observar se uma fêmea copulou com mais de um macho.

As fêmeas de *D. diversipes* emergem com todos seus ovos maduros (prontos para fecundação e/ou postura) e os ovipositam de uma só vez ( $n = 5$ ). Foram contados os números de ovos de 19 fêmeas, obtendo-se um número

Tabela 3: Número observado de células, número de indivíduos emergidos, razão sexual secundária e qui-quadrado para razões 2:1 e 3:1, para os agregados coletados no ano de 2000, nas duas localidades estudadas. \* indica valores significativos ( $\alpha = 0,05$ ).

Agregado	N° de células	N° de indivíduos emergidos		Razão Sexual	$\chi^2$ (2:1)	$\chi^2$ (3:1)
		Fêmeas	Machos			
Inf00-1		79	15	5,3	12,771*	4,099*
Inf00-2	111	17	17	1,0	0,844	0,111
Inf00-3	144	35	13	2,7	4,250*	11,333*
Inf00-4	275	121	48	2,5	1,489	1,043
Inf00-5	91	21	10	2,1	0,016	0,871
Inf00-6	58	14	8	1,8	0,091	1,515
Inf00-7		27	9	3,0	1,125	0
Pat00-1	44	11	2	5,5	1,885	0,641
Pat00-2	176	65	33	2,0	0,005	3,932*
Pat00-3	66	20	8	2,5	0,286	0,190
Pat00-4	67	22	4	5,5	3,769	1,282
Pat00-5	113	26	16	1,6	0,428	3,841
Pat00-6	38	23	8	2,9	0,790	0,011
Pat00-7	66	17	11	1,5	0,446	3,048
Pat00-8	179	55	32	1,7	0,465	6,441*
Pat00-9	177	64	18	3,6	4,780*	0,407
Pat00-10	192	17	11	1,5	0,446	3,048
Pat00-11	107	46	9	5,1	7,127*	2,188
Pat00-12	184	23	27	0,9	9,610*	22,427*
Pat00-13		25	17	1,5	0,964	5,365*
Pat00-14	126	23	12	1,9	0,014	1,610

Tabela 4: Número estimado de células, número de indivíduos emergidos, razão sexual secundária e qui-quadrado para razões 2:1 e 3:1, para os agregados coletados no ano de 2001, nas duas localidades estudadas. \* indica valores significativos ( $\alpha = 0,05$ ).

Agregado	N° de células	N° de indivíduos emergidos		Razão Sexual	$\chi^2$ (2:1)	$\chi^2$ (3:1)
		Fêmeas	Machos			
Inf01-1	35	11	3	3,7	0,300	0,022
Inf01-2	41	18	6	3,0	0,941	4,745*
Inf01-3	38	11	1	11,0	0,118	0,176
Inf01-4	38	16	3	5,3	0,964	0,032
Inf01-5	57	16	9	1,8	11,139*	1,609
Inf01-6	272	63	16	3,9	3,0	0,222
Inf01-7	73	5	9	0,6	0,169	1,459
Inf01-8	65	23	7	3,3	16,560*	0,516
Inf01-9	185	23	6	3,8	12,852*	3,158
Inf01-10	103	10	3	3,3	10,343*	0,444
Inf01-11	239	48	8	6,0	2,0	0,148
Inf01-12	162	21	6	3,5	2,085	0,064
Pat01-1	47	11	4	2,8	2,571	0,048
Pat01-2	378	20	14	1,4	10,547*	2,722
Pat01-3	126	12	5	2,4	6,050*	10,800*
Pat01-4	210	31	11	2,8	7,172*	1,796
Pat01-5	552	120	31	3,9	0,893	0,095
Pat01-6	132	42	12	3,5	0,750	0
Pat01-7	138	51	23	2,2	3,375	1,778
Pat01-8	2933	285	87	3,3	2,623	0,860
Pat01-9	150	100	22	4,5	0,080	1,613
Pat01-10	217	167	50	3,3	6,082*	0,949
Pat01-11	123	28	8	3,5	6,036*	11,524*
Pat01-12	187	36	11	3,3	1,350	0,044
Pat01-13	103	48	15	3,2	2,086	0,287
Pat01-14	182	79	17	4,6	0,615	0,026
Pat01-15	57	3	7	0,4	9,143*	3,429
Pat01-16	164	55	12	4,6	1,500	0,111

médio de 76 ovos por fêmea (min = 42, máx = 105; SD = 20,2). Fêmeas maiores, ou seja, mais pesadas, apresentaram maior número de ovos ( $r = 0,75$ ;  $p < 0,0001$ ).

Durante a oviposição, a fêmea caminhava sobre a superfície foliar escolhendo o local da postura, fazia um pequeno corte na cutícula da folha com o aparelho ovipositor e injetava uma substância dentro deste corte, juntamente com o ovo (Figura 11). Pelas observações, as fêmeas iniciavam a oviposição perto do meio dia e se estendiam nesta tarefa até o final da tarde. Os ovos eram depositados todos de uma vez, numa única folha ou em folhas próximas entre si (que chegavam a se sobrepor), de modo a formar um cluster. Era comum ocorrer em uma mesma árvore mais de uma oviposição. Terminada esta atividade, a fêmea permanecia no pedúnculo foliar onde realizou a postura, mesmo após a morte ( $n = 4$ ). Não foi observado cuidado maternal nesta espécie.

#### 4.1.4 Alimentação das Larvas

A eclosão dos ovos se iniciou, aproximadamente, um mês após a postura, porém algumas posturas levaram mais tempo para eclodir. As larvas se alimentavam de forma gregária, por, aproximadamente, 5 meses (de novembro a março), durante todo o dia e à noite. Durante o período de alimentação, as larvas migravam de um galho para outro da árvore, momento em que larvas de diferentes grupos se misturavam (grupos de alimentação marcados com cores diferentes se misturam). Esta associação também ocorreu entre grupos de larvas de árvores vizinhas, uma vez que as larvas se dispersaram entre elas (dispersão larval acompanhada com o auxílio de marcação com diferentes cores). Foi comum observar larvas de diferentes tamanhos se alimentando num mesmo grupo. No campo, foi possível observar o número de grupos larvais que se alimentavam numa mesma planta. Embora este número mostrou-se variável, foi comum encontrar árvores com 3 ou mais grupos larvais. Em uma árvore foram observados 18 grupos larvais, com larvas em diferentes estágios de desenvolvimento.

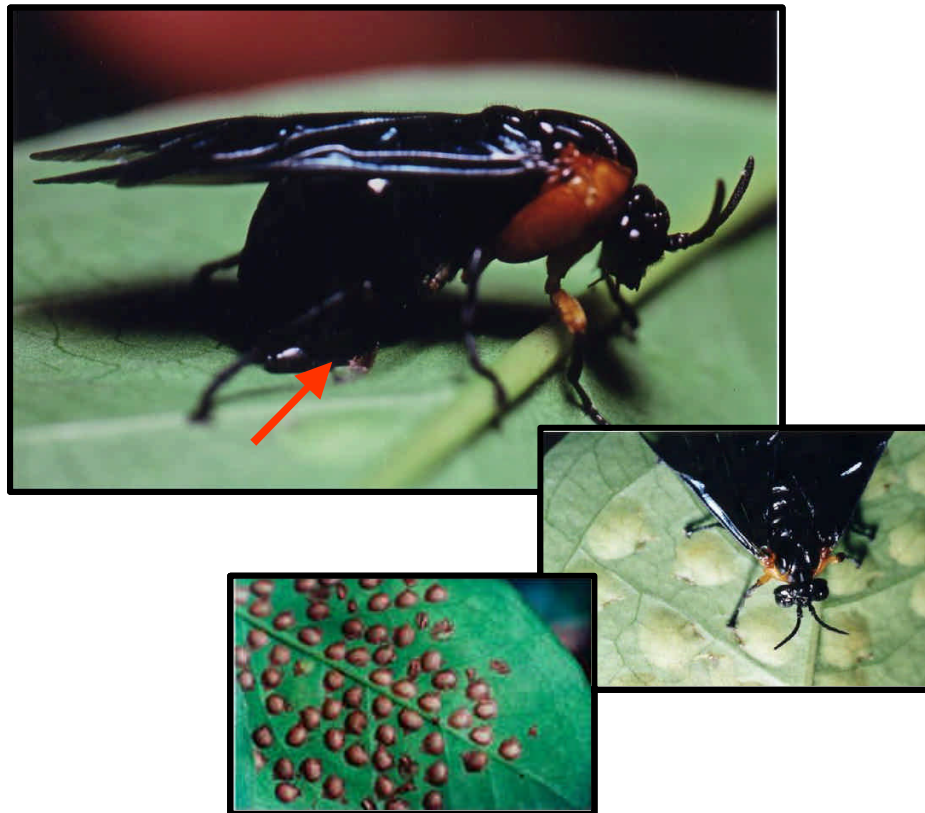


Figura 11: Fêmea de *Digelasinus diversipes* durante a oviposição. A seta mostra o aparelho ovipositor. Nos detalhes, a fêmea sobre a oviposição e uma folha onde toda a postura já foi realizada.



Após este período de alimentação, um grupo de larvas desce pelo caule da planta até bem próximo ao solo para empupar. Os casulos são tecidos comunalmente durante a construção dos agregados (Figura 12).

#### 4.1.5 Capacidade suporte do hospedeiro

Os agregados foram encontrados junto ao solo ou um pouco acima deste, aderidos ao pé das árvores de *Eugenia glazioviana* (Myrtaceae). A altura do agregado em relação ao solo foi medida em 31 agregados. A altura média destes agregados foi de  $35 \pm 52$  cm (min = zero; máx = 180 cm) e seu tamanho muito variável - foram coletados agregados com 38 até 2933 células (ver Tabelas 3 e 4).

O peso médio dos indivíduos emergidos não apresentou correlação significativa com o tamanho dos agregados coletados em 2000 ( $r = 0,3367$  para fêmeas e  $r = -0,1544$  para machos), e em 2001 ( $r = -0,09188$  para fêmeas e  $r = -0,2176$  para machos), considerando  $\alpha = 0,05$  e IC = 95%. A razão sexual encontrada em cada agregado também não apresentou correlação significativa com seu tamanho ( $r = 0,1100$ ; IC 95%). Por outro lado, o tamanho do agregado está correlacionado com o diâmetro da árvore hospedeira ( $r = 0,77$ ; IC = 95%;  $p < 0,0001$ ).

Em muitos casos, o número de casulos de um agregado foi maior que o número médio de ovos encontrados nas fêmeas.

#### 4.2 Análises Eletroforéticas

Para uma amostragem inicial a respeito dos sistemas enzimáticos polimórficos presentes nestas populações foram utilizados 206 indivíduos, de 13 agregados diferentes coletados nas duas áreas de estudo em 2000. Estas amostras foram submetidas à análise eletroforética, de acordo com as condições estabelecidas na Tabela 1. Como relatado anteriormente, foram testados 23 sistemas enzimáticos, correspondentes a 38 locos gênicos. Apenas os locos polimórficos foram escolhidos para a continuidade das análises. Assim, um



Figura 12: Construção dos agregados. As larvas gregárias constroem de maneira desordenada os casulos do agregado. No detalhe, o agregado aderido ao tronco da árvore hospedeira.

total de 404 indivíduos, sendo 375 fêmeas e 29 machos, correspondentes a 38 agregados diferentes, foram analisados eletroforeticamente.

#### 4.2.1 Sistemas Enzimáticos

A seguir estão descritos os sistemas enzimáticos estudados em *Digelasinus diversipes*. As variantes encontradas foram denominadas de acordo com sua mobilidade em relação à origem do gel, de modo que a variante mais freqüente para cada sistema enzimático foi chamada variante 100, e a partir dela foram denominadas as demais, levando em conta sua mobilidade relativa. Os alelos dos locos enzimáticos receberam a mesma denominação das variantes produzidas por eles.

#### Esterases

O perfil eletroforético das esterases de *D. diversipes* é composto por 6 regiões, denominadas de acordo com a mobilidade (Est1 é a mais anódica, e assim sucessivamente), sendo 4 delas polimórficas (Est1, Est3, Est4 e Est5) (Figura 13). As regiões apresentam diferentes intensidades de coloração de acordo com o substrato utilizado, como pode ser visto na Tabela 5.

##### Esterase 1 (Est 1)

Esta enzima apresentou mobilidade a 10,0cm da origem, e foi melhor visualizada em gel TC 8,0. É uma região polimórfica, onde foram encontrados três fenótipos, 106, 106/100 e 100.

##### Esterase 2 (Est 2)

Esta região apresentou mobilidade a 8,0cm da origem e não foi detectado polimorfismo enzimático. Em razão da baixa atividade, é uma região que apresenta dificuldades de melhor caracterização.

##### Esterase 3 (Est 3)

Esta esterase, localizada a 6,5 cm da origem, apresentou duas variantes (108 e 100).

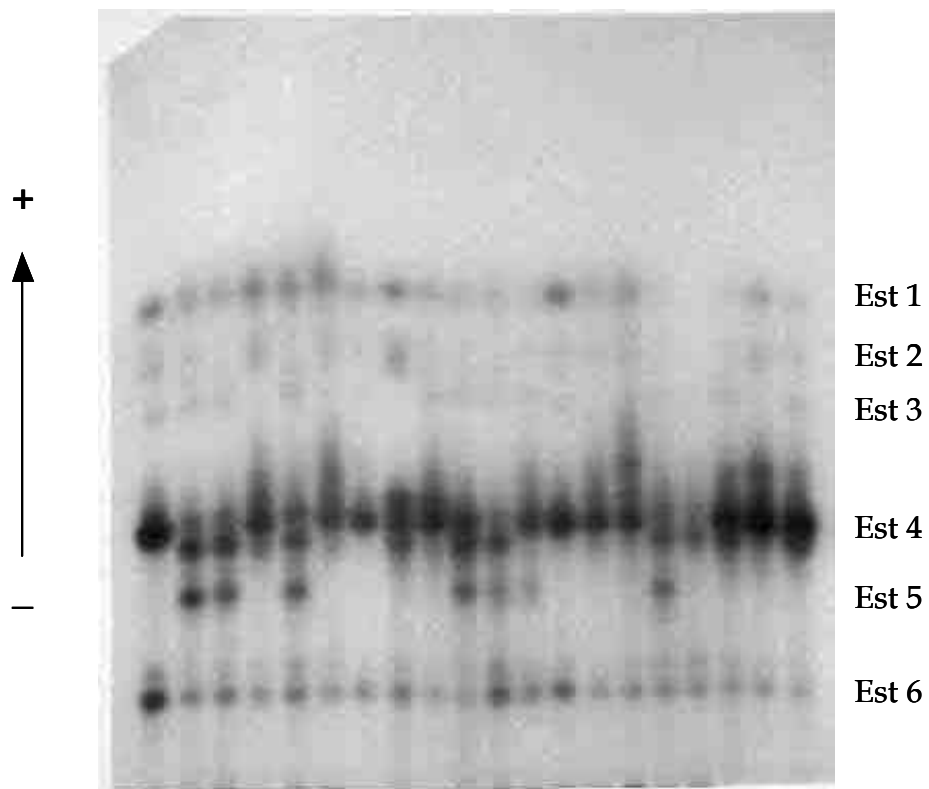


Figura 13: Padrões eletroforéticos de Esterases (Est1, Est2, Est3, Est4, Est5 e Est6) em amostras de *Digelasinus diversipes*, coletadas na EEJ - Luís Antônio.

Tabela 5. Atividade relativa das esterases de *D. diversipes* frente a diferentes substratos.

Regiões	Substratos Fluorogênicos				
	Acetato de Umbeliferona	Butirato de Umbeliferona	Propionato de Umbeliferona	Diacetato de Fluoresceína	$\alpha$ -naftil-acetato
1	+++	+++	+++	++	+
2	++	+	++	+	+
3	+++	+++	+++	--	+
4	++++	++++	++++	+++	++++
5	--	++	--	--	+++
6	--	--	--	--	+++

#### Esterase 4 (Est 4)

Esta região migra a 5,0 cm da origem. Esterase de maior atividade no gel, foi intensamente detectada com todos os substratos. Foram observados três variantes nesta região: 112, 106 e 100. A detecção precisa dos fenótipos existentes depende de três colorações associadas: acetato ou propionato de umbeliferona, butirato de umbeliferona e á-naftil-acetato, uma vez que nesta região as variantes apresentam mobilidades muito próximas, como pode ser visto na Figura 14. Devido a esta dificuldade, consideramos apenas duas variantes neste sistema (112 e 100).

#### Esterase 5 (Est 5)

Esta região foi detectada apenas com butirato de umbeliferona e com á-naftil-acetato, encontrando-se a 4,5cm da origem. Duas variantes eletroforéticas foram observadas, denominadas 108 e 100.

#### Esterase 6 (Est 6)

Esta região só foi visualizada com o uso de á-naftil-acetato. Localizada a 2,0cm da origem, não apresentou polimorfismo enzimático.

### Peptidases

Três regiões de atividade peptidásica foram detectadas, referentes a *PepA*, *PepD* e *PepB*; todas se apresentaram polimórficas (Figura 15).

#### Peptidase A (*PepA*)

O perfil eletroforético para *PepA* foi obtido a partir do substrato valil-leucina (Val-Leu), apresentando-se a 6,0cm da origem. Foram encontradas duas variantes, 114 e 100.

#### Peptidase B (*PepB*)

O perfil eletroforético da *PepB* foi obtido utilizando-se o substrato leucil-glicil-glicina (Leu-Gly-Gly). Esta região está localizada a 9,0cm da origem e apresentou duas variantes, 106 e 100.

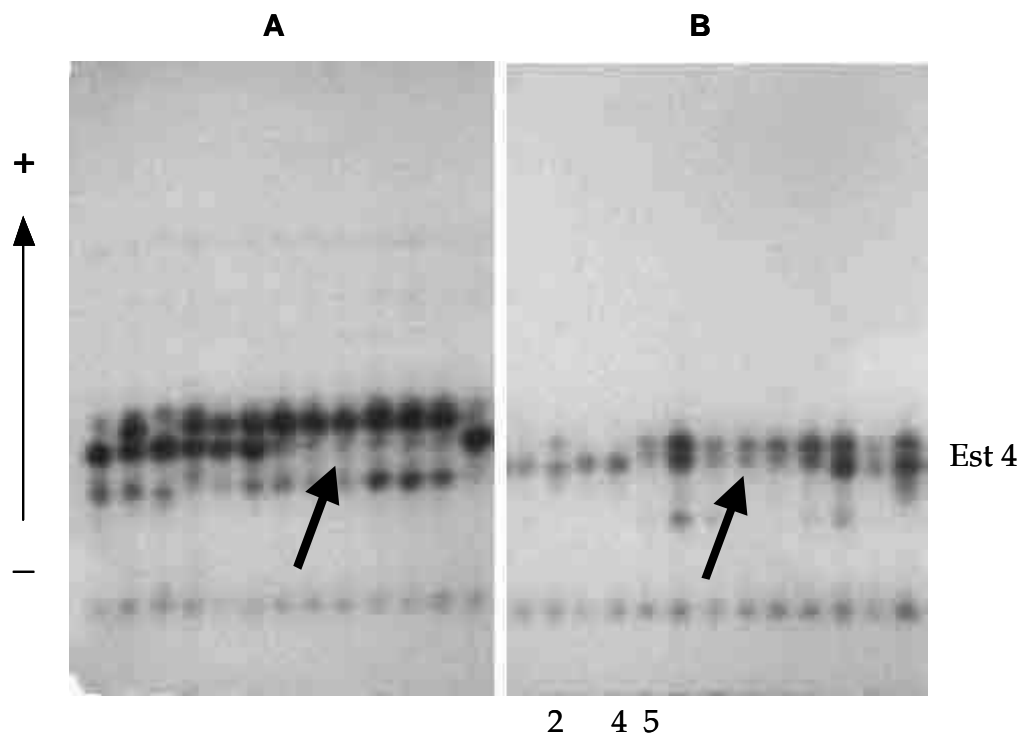


Figura 14: Padrões eletroforéticos de Esterases, evidenciando a Est 4. Em A está representado um gel Tris-citrato pH7,5, e em B um gel Histidina pH6,6. As setas indicam a mesma amostra. A variante 106 é evidenciada apenas no gel B. Os números 2, 4 e 5 indicam, respectivamente, os fenótipos 112/100, 100 e 112/106.

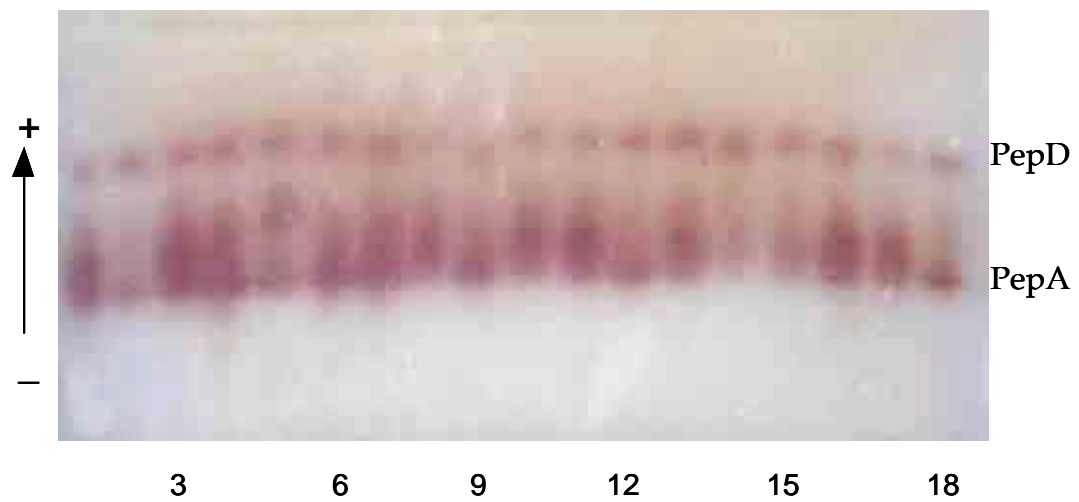


Figura 15: Padrões eletroforéticos de Peptidases (PepA e PepD) em amostras de *Digelasinus diversipes*, coletadas na EEJ - Luís Antônio. Na região da PepA as amostras 13 e 18 representam os fenótipos 114/100 e 100, respectivamente. Na região da PepD os fenótipos homozigotos 106 e 100 estão representados nas amostras 9, 10 (respectivamente), enquanto que o heterozigoto 106/100 é representado pela amostra 14.



### Peptidase D (*PepD*)

O perfil eletroforético desta região foi obtido a partir do substrato leucil-prolina (Leu-Pro). Com mobilidade a 9,0cm da origem, duas variantes, 100 e 88, foram detectadas.

### Leucil-amino-peptidase (*Lap*)

Uma região bem definida da *Lap* foi revelada a 9,0cm da origem, utilizando L-leucil- $\beta$ -naftilamida como substrato. Não foi encontrado polimorfismo enzimático nesta região.

### Diaforases (*Dia*)

Duas regiões definidas foram reveladas a 7,0 e 9,0cm da origem do gel referentes à atividade diaforásica dependente de NADH e NADPH, respectivamente. Estas regiões não apresentaram polimorfismo enzimático.

### Arginina Quinase (*ArgK*)

A atividade desta enzima foi visualizada a 9,0cm da origem, porém não se detectou polimorfismo enzimático.

### Isocitrato desidrogenase (*Icd*)

Esta enzima apresentou uma região facilmente visualizada a 3,0cm da origem do gel. Nesta região, três fenótipos foram caracterizados: 133, 133/100 e 100.

### Manose 6-fosfato desidrogenase (*Mpi*)

A *Mpi* apresentou uma região de atividade a 7,5cm da origem. Três variantes foram observadas: 100, 93 e 86. O gel com coloração para esta enzima pode ser visualizado na Figura 16.

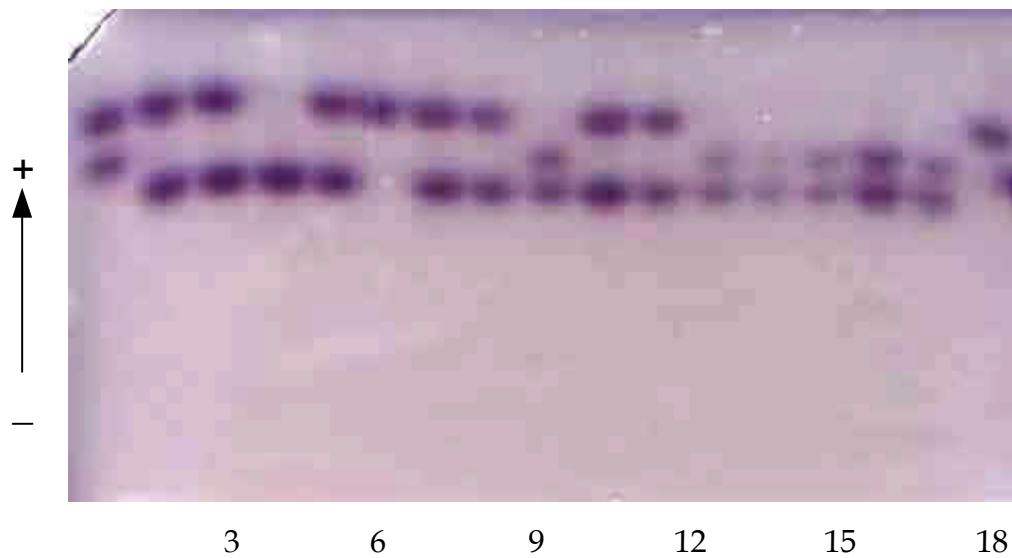


Figura 16: Padrões eletroforéticos de Mpi em amostras de *Digelasinus diversipes*, coletadas na EEJ - Luís Antônio. Os fenótipos homozigotos 86, 100 e 93 estão representados pelas amostras 4, 6 e 18, enquanto que os fenótipos heterozigotos 100/93, 100/86 e 93/86 estão representados em 1, 7 e 9, respectivamente.

#### $\alpha$ -Glicerofosfato desidrogenase ( *$\alpha$ -Gpdh*)

O padrão eletroforético desta enzima apresentou 3 regiões a 6,0cm ( $\alpha$ -Gpdh 1), 3,0cm ( $\alpha$ -Gpdh 2) e 1,5cm ( $\alpha$ -Gpdh 3) da origem. Destas,  $\alpha$ -Gpdh 1 e  $\alpha$ -Gpdh 2 apresentaram fenótipos distintos, porém tais fenótipos não apresentaram características de variação alélica (possivelmente, variação epigenética).

#### Glicose-6-fosfato isomerase (*Gpi*)

A *Gpi* apresentou uma região definida a 6,0cm da origem; não foi detectado polimorfismo enzimático.

#### Fumarase (*Fum*)

Esta enzima migra a 2,0cm da origem do gel e apresentou uma banda de fácil visualização, porém não foi detectado polimorfismo enzimático.

#### Aconitase (*Acon*)

A atividade desta enzima pode ser facilmente visualizada a 3,5cm da origem, porém sem a presença de variantes eletroforéticas.

#### Malato desidrogenase (*Mdh*)

Três regiões de atividade foram definidas: as formas dependentes de NAD, uma citoplasmática e outra mitocondrial, e a forma dependente de NADP<sup>+</sup>, citoplasmática, referida como *Me*. A forma mitocondrial apresentou mobilidade catódica (1,5cm) e ausência de variantes, enquanto que as formas citoplasmáticas migraram a 4,0cm (*Mdh*) e 2,0cm (*Me*), e apenas a primeira apresentou polimorfismo. Nesta detectou-se a presença de duas variantes, 120 e 100, e duas outras variantes raras, 110 e 87, detectadas em apenas uma das amostras.

### Fosfoglicomutase (*Pgm*)

A região da *Pgm* apresentou mobilidade a 4,0cm. Foram encontradas duas variantes, 112 e 100, como pode ser visto na Figura 17.

### Hexoquinase (*Hk*)

Esta enzima apresentou uma região a 2,0cm da origem do gel, porém não foi detectado polimorfismo enzimático.

### Superóxido dismutase (*Sod*)

Duas regiões foram reveladas: *Sod1* (4,0cm) e *Sod2* (2,0cm), com apenas a primeira região apresentando polimorfismo. Na *Sod1* foram observadas duas variantes, 100 e 87.

### Transaminase Glutâmica-Oxalacética (*Got*)

Duas regiões de atividade foram evidenciadas, uma a 5,0cm e outra bem próxima à origem; em ambas, não foi observado variação alozímica.

### $\beta$ -Hidroxibutirato Desidrogenase ( $\beta$ -*HBdh*)

Esta enzima apresentou uma região de atividade a 6,0cm da origem, revelada quando se utilizou ácido glicônico, mas não  $\beta$ -hidroxibutirato de sódio, como substratos. Não foi detectado polimorfismo enzimático nesta região.

### Fosfatase ácida (*Acp*)

Três regiões de atividade foram definidas a partir da utilização de dois substratos ( $\alpha$ - e  $\beta$ -naftil-fosfato ácido de sódio). Estas fosfatases migraram a 6,0cm (*Acp1*), 2,5cm (*Acp2*) e 1,5cm (*Acp3*) da origem. A região *Acp1* apresentou duas variantes, 114 e 100, bem como a região *Acp2*, as variantes 100 e 80 (Figura 18). A região *Acp3* não apresentou polimorfismo enzimático.

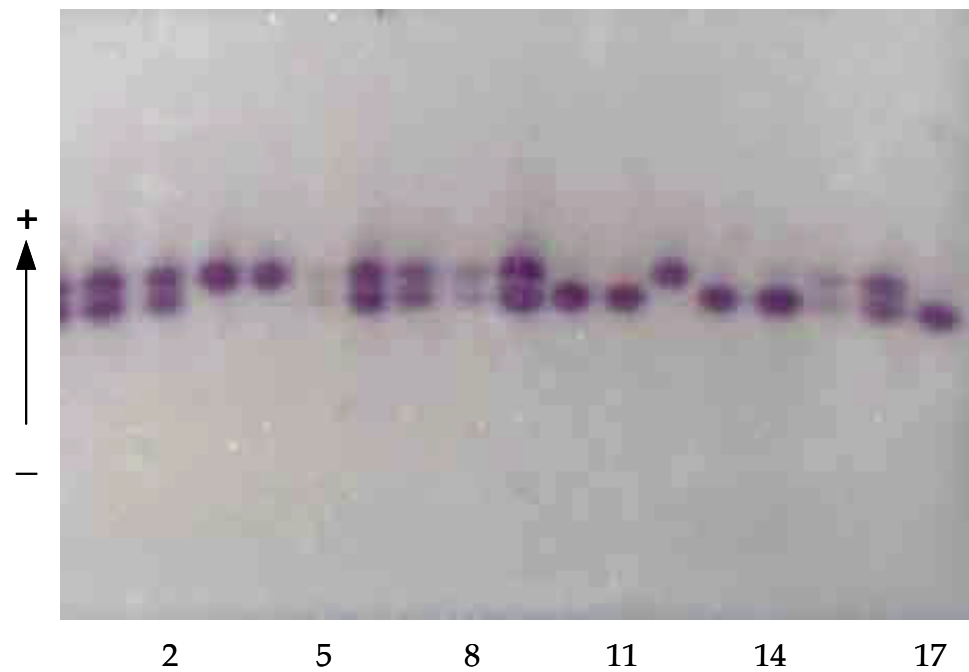


Figura 17: Padrões eletroforéticos de Pgm em amostras de *Digelasinus diversipes*, coletadas na EEJ - Luís Antônio. Os fenótipos 112, 100 e 112/100 estão representados pelas amostras 3, 11 e 16, respectivamente.

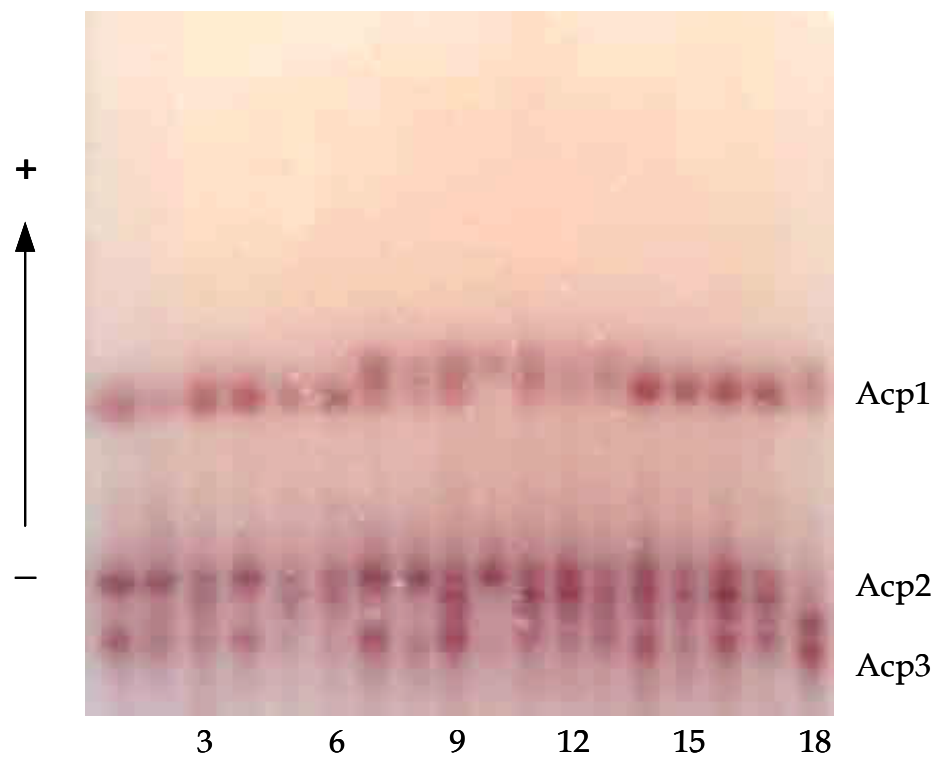


Figura 18: Padrões eletroforéticos de Fosfatase ácida (Acp1, Acp2 e Acp3) em amostras de *Digelasinus diversipes*, coletadas na EEJ - Luís Antônio. Na região Acp1, os fenótipo 114, 114/100 e 100 podem ser observados nas amostras 10, 13 e 15, respectivamente. Em Acp2, os fenótipos 100, 100/80 e 80 podem ser observados nas amostras 4, 9 e 18, respectivamente. A região Acp3 não apresenta polimorfismo enzimático.

As enzimas Piruvato Quinase (*Pk*), Adenilato Quinase (*Ak*), Aldolase (*Ald*), 6-Fosfogliconato Desidrogenase (*6Pgd*) e Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (*G6pd*) também foram testadas, porém não evidenciaram regiões de atividades.

#### 4.2.2 Estimativas de diversidade genética

Dos 38 locos enzimáticos amostrados, 16 deles exibiram polimorfismo (42% - critério 1% - ver Tabela 6). Um número muito pequeno de indivíduos (agregados) coletados em Inf01 foram analisados, e por este motivo estes resultados não foram incluídos nas análises estatísticas. Por sua vez, os locos *Est5*,  $\alpha Gp1$ ,  $\alpha Gp2$  não foram incluídos nas análises em razão da dificuldade na identificação dos fenótipos devido, aparentemente, a ligeiras diferenças de idade entre os adultos analisados. A porcentagem de locos polimórficos (P), o número médio de alelos (A), as frequências alélicas, o valor de  $\chi^2$  de equilíbrio genético e o número de indivíduos analisados para cada loco e amostra estão sumarizados na Tabela 6.

As análises demonstraram que o loco *Mdh* não se encontra em equilíbrio na amostra Pat00, da mesma forma que os locos *PepB*, *PepD* e *Acp1* na amostra Pat01 e os locos *PepB* e *Pgm* na amostra Inf01. Foram analisados 29 machos adultos de cinco agregados diferentes, não tendo sido detectado nenhum macho diplóide entre eles.

Os maiores valores de heterozigidade intraloco ( $H_i$ ) foram observados para o loco *Mpi* nas três amostras analisadas (0,41, 0,65 e 0,55, para as amostras Pat00, Pat01 e Inf01, respectivamente), enquanto que os menores valores foram observados para o loco *Est1* nas amostras Pat00 (0,013) e Inf01 (0,10) e para o loco *Mdh* (0,055) na amostra Pat01. A heterozigidade média observada ( $H$ ) foi de  $0,052 \pm 0,018$  em Pat00, de  $0,097 \pm 0,027$  em Pat01 e de  $0,101 \pm 0,028$  em Inf01. O valor médio da heterozigidade média observada ( $H$ ) para as três amostras foi  $0,094 \pm 0,025$ .

Tabela 6: Frequências alélicas (e respectivos desvios padrão), valores de  $\chi^2$  de equilíbrio genético (número de indivíduos analisados entre parênteses), proporção de locos polimórficos (P), número médio de alelos (A), e heterozigosidade média observada (H) para os locos polimórficos em *Digelasinus diversipes*. \* indica valores significativos ( $\alpha = 0,05$ ).

Locus	Allele	População		
		Pat00	Pat01	Inf01
<i>Pep A</i>	114	0,01 ( $\pm 0,001$ )	0,12 ( $\pm 0,005$ )	0,11 ( $\pm 0,007$ )
	100	0,99	0,88	0,89
	$\chi^2$ (n)	0,014 (76)	0,167 (181)	1,707 (107)
<i>Pep B</i>	106		0,39 ( $\pm 0,016$ )	0,30 ( $\pm 0,023$ )
	100		0,61	0,70
	$\chi^2$ (n)		18,621* (126)	10,906* (108)
<i>Pep D</i>	100		0,62 ( $\pm 0,015$ )	0,55 ( $\pm 0,014$ )
	88		0,38	0,45
	$\chi^2$ (n)		6,343* (109)	1,070 (54)
<i>Acp 1</i>	114	0,07 ( $\pm 0,007$ )	0,20 ( $\pm 0,009$ )	0,26 ( $\pm 0,013$ )
	100	0,93	0,80	0,74
	$\chi^2$ (n)	0,242 (43)	7,390* (157)	0,538 (98)
<i>Acp 2</i>	100	0,91 ( $\pm 0,009$ )	0,67 ( $\pm 0,012$ )	0,64 ( $\pm 0,016$ )
	80	0,09	0,33	0,36
	$\chi^2$ (n)	0,452 (43)	1,221 (160)	0,855 (107)
<i>Icd</i>	133	0,18 ( $\pm 0,012$ )	0,15 ( $\pm 0,007$ )	0,07 ( $\pm 0,005$ )
	100	0,82	0,85	0,93
	$\chi^2$ (n)	1,453 (76)	1,137 (182)	0,691 (108)
<i>Mpi</i>	100	0,55 ( $\pm 0,024$ )	0,44 ( $\pm 0,013$ )	0,60 ( $\pm 0,016$ )
	86	0,27 ( $\pm 0,020$ )	0,40 ( $\pm 0,013$ )	0,12 ( $\pm 0,007$ )
	93	0,18 ( $\pm 0,014$ )	0,17 ( $\pm 0,007$ )	0,28 ( $\pm 0,014$ )
	$\chi^2$ (n)	3,847 (51)	0,719 (169)	10568 (106)
<i>Est 1</i>	106	0,01 ( $\pm 0,0005$ )	0,09 ( $\pm 0,004$ )	0,05 ( $\pm 0,003$ )
	100	0,99	0,91	0,95
	$\chi^2$ (n)	0,003 (76)	1,809 (182)	0,311 (108)
<i>Est 3</i>	108	0,01 ( $\pm 0,001$ )	0,00	0,00
	100	0,99	1,00	1,00
	$\chi^2$ (n)	0,014 (74)	182	108
<i>Est 4</i>	112	0,34 ( $\pm 0,018$ )	0,23 ( $\pm 0,009$ )	0,10 ( $\pm 0,006$ )
	100	0,66	0,77	0,90
	$\chi^2$ (n)	3,140 (76)	0,015 (181)	1,389 (108)
<i>Sod 1</i>	100	0,93 ( $\pm 0,005$ )	0,85 ( $\pm 0,007$ )	0,42 ( $\pm 0,016$ )
	87	0,07	0,15	0,58
	$\chi^2$ (n)	0,463 (76)	0,017 (1640)	2,286 (108)
<i>Pgm</i>	112	0,20 ( $\pm 0,013$ )	0,37 ( $\pm 0,012$ )	0,49 ( $\pm 0,017$ )
	100	0,80	0,63	0,51
	$\chi^2$ (n)	1,688 (76)	0,111 (179)	7,245* (108)
<i>Mdh c</i>	120	0,08 ( $\pm 0,006$ )	0,03 ( $\pm 0,001$ )	0,09 ( $\pm 0,005$ )
	100	0,92	0,97	0,89 ( $\pm 0,007$ )
	110 + 87	0	0	0,02 ( $\pm 0,001$ )
	$\chi^2$ (n)	15,882* (76)	0,145 (182)	1,120 (108)
	P	0,34	0,34	0,31
	A	1,4	1,4	1,6
	H	0,052 ( $\pm 0,018$ )	0,097 ( $\pm 0,027$ )	0,101 ( $\pm 0,028$ )



Os valores da estatística F estão sumarizados na Tabela 7. Um valor significativo de  $F_{ST}$  (0,070;  $\chi^2 = 458,862$ ;  $p < 0,05$ ;  $GL=28$ ) e um valor não significativo de  $F_{IS}$  (0,062;  $\chi^2 = 29,9$ ;  $p < 0,05$ ;  $GL=28$ ) foram encontrados. Valores significativos de  $F_{ST}$ , mas não de  $F_{IS}$  foram observados quando as populações foram analisadas duas a duas. O coeficiente de distância genética de Nei (1978) foi de 0,017 entre Pat00-Pat01, 0,065 entre Pat00-Inf01 e 0,041 entre Pat01-Inf01.

Para a construção dos dendogramas a partir das distâncias genéticas de Nei (1987) foram utilizados apenas sete dos locos polimórficos (PepA, Est1, Est4, Mdhc, Pgm, Icd e Mpi), por apresentarem dados em todos os agregados analisados. A Figura 19 ilustra o dendrograma gerado para os agregados coletados na Lagoa dos Patos nos anos de 2000 e 2001. A Figura 20 representa o dendrograma gerado para os agregados coletados nas lagoas do Pato e do Infernã, no ano de 2001.

O grau de parentesco genético médio foi calculado separadamente entre os agregados de cada amostra, sendo  $0,36 \pm 0,15$  na Pat00,  $0,23 \pm 0,09$  na Pat01 e  $0,44 \pm 0,10$  na Inf01.

Tabela 7: Coeficientes da Estatística-F e suas significâncias determinadas a partir de locos enzimáticos de *Digelasinus diversipes*. \* indicam valores significativos; <sup>NS</sup> indicam valores não significativos ( $\alpha = 0,05$ ).

Locus	F <sub>ST</sub>	$\chi^2$	F <sub>IS</sub>	$\chi^2$	gl	F <sub>IT</sub>
<i>PepA</i>	0,031	22,568	0,045	0,737	2	0,013
<i>Est1</i>	0,025	18,300	0,079	2,284	2	0,052
<i>Est3</i>	0,004	3,504	0,011	0,053	2	0,006
<i>Est4</i>	0,053	38,690	0,068	1,688	2	0,117
<i>Acp1</i>	0,028	19,992	0,15	8,033	2	0,174
<i>Acp2</i>	0,076	47,120	0,018	0,100	2	0,059
<i>Mdhc</i>	0,014	30,744	0,111	4,509	6	0,124
<i>Pgm1</i>	0,060	43,560	0,147	7,844	2	0,198
<i>Sod1</i>	0,256	178,176	0,062	1,338	2	0,302
<i>Icd1</i>	0,018	13,176	0,046	0,774	2	0,028
<i>Mpi1</i>	0,033	43,032	0,087	2,467	4	0,117
Média	0,070	458,9*	0,062	29,9 <sup>NS</sup>	28	0,127

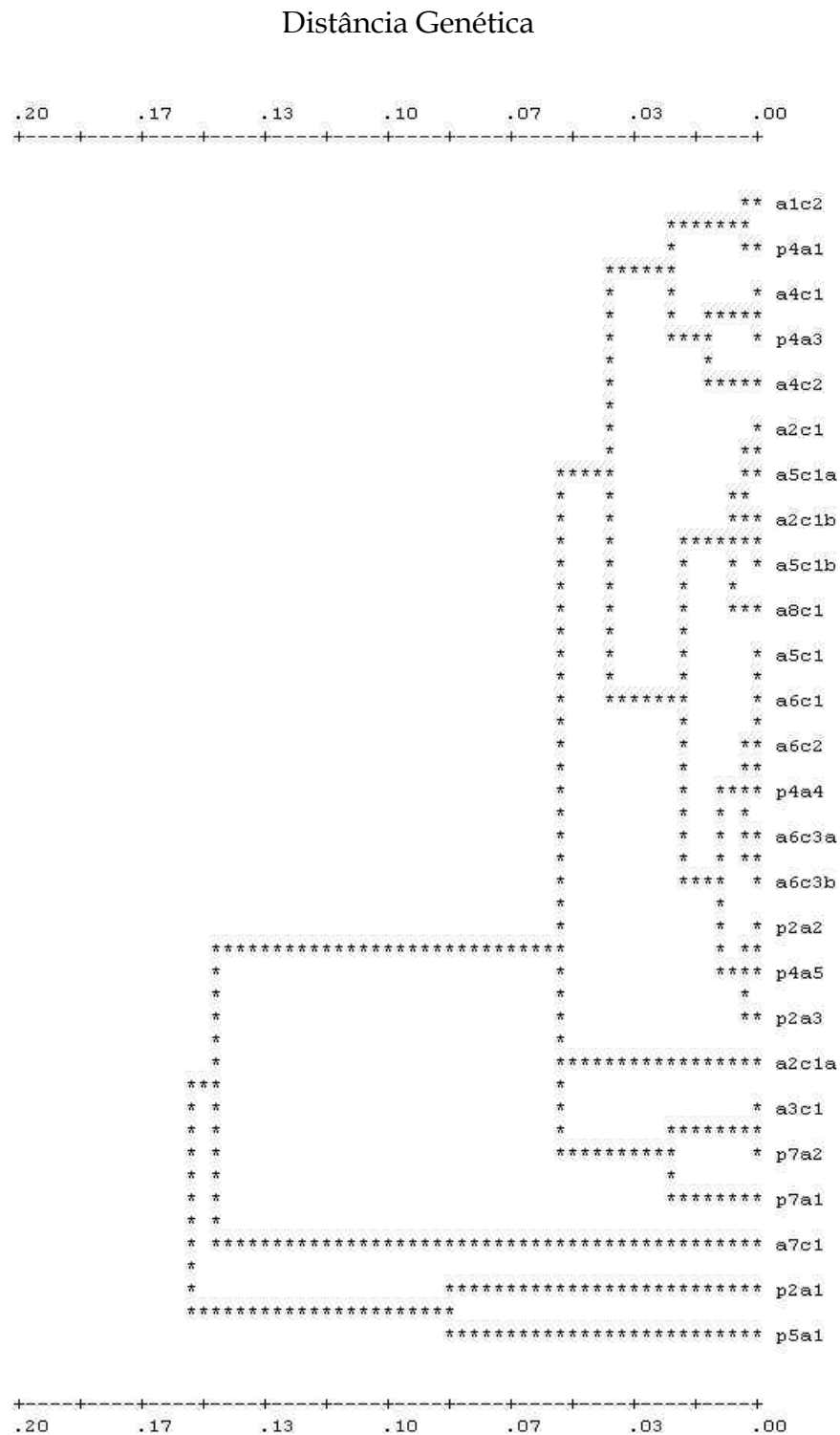


Figura 19: Dendrograma de distância genética segundo Nei (1978) para agregados de *Digelasinus diversipes* coletados na Lagoa dos Patos em 2000 e 2001.

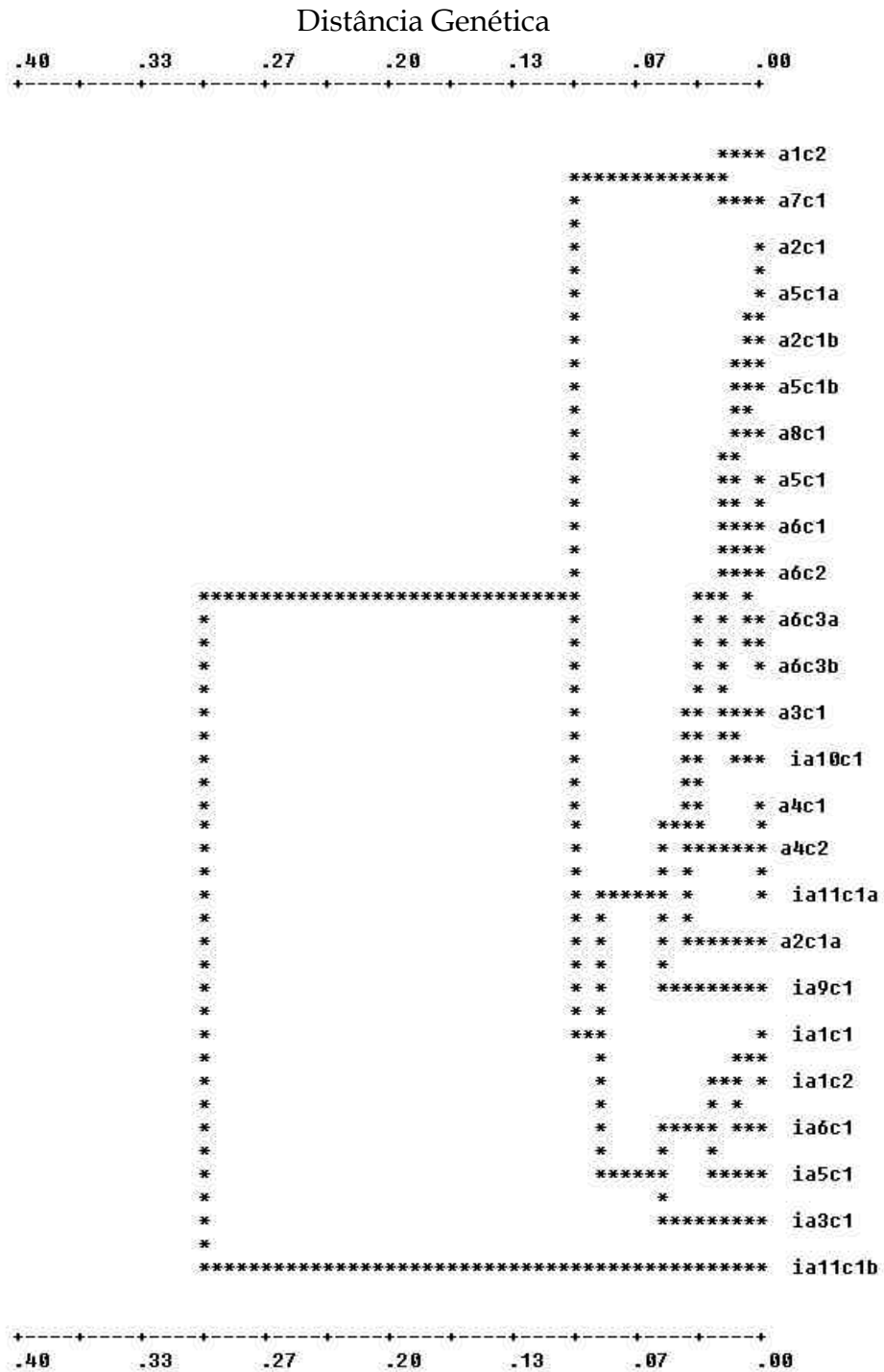


Figura 20: Dendrograma de distância genética segundo Nei (1978) para agregados de *Digelasinus diversipes* coletados nas lagoas do Pato e do Infernãõ em 2001.

## 5.1 Biologia de *Digelasinus diversipes*

### 5.1.1 Ciclo de Vida

*Digelasinus diversipes* é uma espécie univoltina, os adultos são encontrados a partir do início de Outubro, e as larvas estão ativas de Novembro a Março, podendo ou não entrar em diapausa. O ciclo de vida descrito no presente trabalho condiz com os relatos de Penteado-Dias (1991).

Os agregados coletados em 2000, nas duas áreas de estudo, apresentaram um período de emergência longo, iniciando em setembro e prolongando-se até maio. Já o período de emergência dos agregados coletados em 2001 foi de outubro a janeiro. As diferenças encontradas durante o período de emergência dos dois anos de coleta podem ser consequência do manuseio destes agregados em laboratório, onde fatores como luz, umidade e temperatura podem ter alterado o desenvolvimento dos indivíduos durante o primeiro ano.

Os machos de *Digelasinus diversipes* emergiram primeiro que as fêmeas, e estas emergiram com todos seus ovos prontos para serem fecundados e/ou ovipositados. Estas observações estão de acordo com relatos da literatura que mostram estas particularidades ocorrendo não só em outras espécies de Argidae, como *T. olfersii* e *D. diasi*, estudados por Dias (1975 e 1976), mas também como sendo características das espécies pertencentes à Tenthredinoidea (Dias, 1981).

Em laboratório, pudemos observar que machos e fêmeas procuram copular entre si logo após o nascimento. Este comportamento é bastante difundido entre as espécies de sínfita, uma vez que, de maneira geral, os adultos são efêmeros, vivendo apenas poucos dias após a eclosão, como é o caso de *Digelasinus diversipes*. Em poucas espécies foram observados adultos sobrevivendo por mais de duas semanas (período médio desde a oviposição até

a eclosão das larvas - Dias, 1981; Smith, 1993), mas este período pode se estender, como no caso de *T. olfersii*, *D. diasi*, *Syzygonia* e *Perga*, onde as fêmeas apresentam cuidado maternal de ovos e larvas jovens (Dias, 1975 e 1976; Smith, 1993).

O univoltismo em sínfita é amplamente difundido entre as espécies, porém em alguns casos o número de gerações pode ser bastante variável e dependente das condições climáticas (Knerer, 1993; Baumann *et al.*, 2003). Em *Diprion pini*, por exemplo, algumas populações são bivoltinas, podendo apresentar uma terceira geração por ano, enquanto que outras populações são univoltinas, com diapausa prolongada (Baumann *et al.*, 2003). Algumas espécies apresentam até quatro gerações por ano, como é o caso de *Dielocerus diasi* (Dias, 1976) e esse número pode ser ainda maior, de 3 a 7 gerações, em *Athalia rosae* (Oishi *et al.*, 1993). Por outro lado, algumas espécies de altitudes e latitudes extremas podem levar até dois anos para completar seu ciclo de vida (Knerer, 1993).

A diapausa é um atraso no desenvolvimento que facilita a sobrevivência durante os períodos desfavoráveis, quando o crescimento normal está prejudicado (Tauber & Tauber, 1976 em Knerer, 1993). Quando as condições se tornam favoráveis, o desenvolvimento se completa. Este período de dormência ocorre principalmente durante o estágio larval, dentro dos casulos (Knerer, 1993), porém também pode ocorrer nos ovos (*Neodiprion*), nos adultos (*Neodiprion maurus*) ou na fase de pré-pupa, como no caso de *D. diversipes* e *T. olfersii* (Dias, 1975).

Os agregados de *D. diversipes* foram parasitados por *Lymeon dieloceri*, *Perilampus* sp. e *Conura (Spilochalcis)* sp., assim como relatado por Penteado Dias (1991). Em Symphyta, é comum que ovos, larvas e pré-pupas sejam parasitadas por outros himenópteros. As larvas apresentam maior susceptibilidade aos parasitas por se alimentarem expostas na vegetação (Smith, 1993). Em espécies de importância econômica, a relação parasita-sínfita é estudada em detalhes, o mesmo não ocorre na relação predador-sínfita que é

pouco conhecida (Smith, 1993). Para se proteger contra predadores e parasitóides, as larvas desenvolveram algumas adaptações como alimentação na face interna da folha, coloração mimética, pêlos e espinhos e alimentação gregária (Smith, 1993; Codella & Raffa, 1993).

O dimorfismo sexual encontrado em *D. diversipes*, com fêmeas maiores do que os machos, também foi relatado por Dias (1981) para *T. olfersii* e *D. diasi*, e em 11 espécies de sínfita revisadas por Craig & Mopper (1993). Estes autores atribuem esta diferença de peso entre machos e fêmeas inclusive ao número de estágios larvais destes insetos, uma vez que os machos geralmente apresentam um estágio larval a menos que as fêmeas.

As diferenças encontradas no peso de machos e fêmeas entre os locais de estudo, nos dois anos de coleta, podem ser reflexo de diferenças qualitativas e quantitativas na alimentação destes indivíduos durante a fase larval.

### 5.1.2 Razão Sexual

A razão sexual secundária encontrada nos adultos de *D. diversipes* foi diferente de 1:1 (fêmeas : macho), favorecendo o maior número de fêmeas. Os estudos mais antigos sobre razão sexual em Symphyta (revisados por Dias, 1981), trazem discordância neste aspecto. Alguns autores relatam razão sexual secundária próxima de 1:1, mas alegam que podem existir variações dentro de uma espécie, de acordo com a localidade estudada. Outros estudos apontam para o predomínio de fêmeas no estágio adulto de algumas espécies. Há ainda, relatos de que algumas espécies de Tenthredinidae, Cimbicidae, Pergidae e Diprionidae (mas não em Argidae) apresentam partenogênese telítoca, onde os indivíduos haplóides dão origem a fêmeas e não a machos, e a presença de machos é rara e não funcional. Por outro lado, a presença de partenogênese arrenótoca (onde machos são produzidos a partir de ovos não fecundados, e fêmeas a partir de ovos fecundados), relatada na maioria das espécies de tentredinídeos, mostra sempre o predomínio de fêmeas, enviesando a razão

sexual secundária mais comumente para 2 ou 3 fêmeas para cada macho. Estudos mais recentes sobre o assunto (revisados por Craig & Mopper, 1993) também mostram o predomínio de razão sexual enviesada para fêmeas. Estes autores relatam que 43 espécies apresentaram razão sexual favorecendo fêmeas, 2 espécies apresentaram razão sexual favorecendo machos e em 5 espécies a razão sexual não foi diferente de 1:1.

Desvios da razão sexual 1:1 em Hymenoptera têm sido extensivamente relatados e as explicações recaem sobre a própria haplodiploidia. Segundo Fisher (1930), se o benefício reprodutivo do investimento parental em ambos os sexos é igual e linear, então é de se esperar que a razão sexual seja 1:1. Por outro lado, se este não for igual e linear, é esperado que a razão sexual seja desviada favorecendo um dos sexos, para que possa haver uma compensação no investimento parental (investimento igual, apesar de números diferentes), como ocorre em himenópteros.

Em Symphyta, tanto a razão sexual primária como a secundária podem apresentar desvios. Entre as causas que alteram a razão sexual primária estão a partenogênese telítica (onde não ocorre a produção de machos) e o controle da fêmea em fertilizar ou não os ovos no momento da oviposição. Já os desvios encontrados na razão sexual secundária podem ser explicados pela mortalidade diferencial de machos (a haplodiploidia permite a expressão acentuada de alelos deletérios) e por características do próprio ciclo de vida da espécie (os machos são menores, mais leves e voam mais rápido do que as fêmeas) (Craig & Mopper, 1993). Um outro motivo pelo qual a razão sexual poderia se desviar da esperada 1:1 é a existência de acasalamento endogâmico nestas populações. Hamilton (1967) propôs o modelo de Competição Local por Acasalamento (LMC) para explicar o efeito do endocruzamento na razão sexual. Neste modelo, as fêmeas e os machos se acasalam no local onde emergiram e só depois é que as fêmeas dispersam para fazer a oviposição. Assim, o endocruzamento está correlacionado com o número de fêmeas que colonizaram aquele hospedeiro, e para minimizar a competição entre irmãos pelo



acasalamento, são produzidos machos em número suficiente apenas para garantir a fertilização das fêmeas.

Embora não tenham sido observados níveis significativos de endogamia nesta espécie (discutidos mais adiante) e alguns detalhes do ciclo de vida referentes a acasalamento e dispersão não foram observados em campo, dados laboratoriais apontam que machos e fêmeas de *D. diversipes* se acasalam logo após a emergência. Embora resultados semelhantes tenham sido encontrados por Dias (1981) em seus estudos com *D. diasi* e *T. olfersii*, ainda assim é prematuro definir qual, ou quais fatores, levaram à razão sexual enviesada para fêmeas observada neste estudo.

### 5.1.3 Cópula, Oviposição e Cuidado Maternal

Pouco se sabe sobre o comportamento de acasalamento em sínfita. A maioria dos estudos trata de fêmeas que acasalam apenas uma vez, enquanto que os machos acasalam mais de uma vez. Este comportamento corresponde ao observado em laboratório para *D. diversipes*, e ao observado por Dias (1976) para *D. diasi*.

Muitos relatos tratam de feromônios sexuais exalados pelas fêmeas para a atração de machos para a cópula. Fêmeas virgens atraem um grande número de machos (Anderbrant, 1993) e, após a cópula, a fêmea passa a não ser mais atrativa aos machos. Ainda que algum macho se aproxime para uma nova cópula, este é repellido pela fêmea (Dias, 1981). Por outro lado, os machos estão sempre prontos para uma nova cópula. De modo geral, as fêmeas recém emergidas permanecem na árvore hospedeira para a cópula, e somente depois que foram inseminadas pelos machos é que saem para o vôo de dispersão, a fim de encontrar o local onde depositarão seus ovos.

As fêmeas de *D. diversipes* depositam seus ovos todos de uma vez, numa única folha, formando clusters. Comportamento semelhante foi observado em fêmeas de *T. olfersii* e *D. diasi* (Dias, 1975 e 1976). Casos como estes são conhecidos por semelparidade. Este tipo de comportamento é bastante

difundido em diprionídeos, porém, menos encontrado em tentredinídeos, onde é mais comum a oviposição de um ou poucos ovos por folha, em folhas de diferentes plantas (Craig & Mopper, 1993).

Em sínfita, é comum encontrar várias fêmeas ovipositando no mesmo hospedeiro. Evidência disto em *D. diversipes* é o grande número de grupos de larvas ainda nos primeiros ínstars de desenvolvimento que se alimentam em uma mesma planta. Alguns estudos mostram que, de modo geral, a distribuição das árvores infestadas por sínfitas não segue distribuição normal, ou seja, há árvores hospedeiras mais infestadas do que seria esperado ao acaso, e vice-versa (Dias, 1981; Mopper & Whitham, 1992; Emery, 1998).

Apesar de Benson (1938, em Dias, 1981) ter reportado cuidado maternal em *D. diversipes*, este comportamento não foi observado durante este estudo. Dias (1981) apresenta uma revisão deste comportamento em sínfita. Segundo este autor, 18 espécies (10 gêneros, 4 subfamílias), principalmente pertencentes a Argidae e Pergidae, apresentam algum tipo de cuidado maternal. Nas espécies neotropicais *T. olfersii* e *D. diasi* (Dias, 1975 e 1976) as fêmeas apresentam uma complexa série de comportamentos em defesa de sua postura.

#### 5.1.4 Alimentação das Larvas

Em *D. diversipes*, os ovos demoram cerca de um mês após a postura para eclodirem. Relatos da literatura (Dias, 1975, 1976; Smith, 1993) informam que as larvas de sínfita demoram, em média, uma ou duas semanas para eclodirem.

As larvas de sínfita apresentam comportamento, morfologia e fisiologia semelhantes às lagartas de Lepidoptera. A alimentação das larvas de sínfita pode ocorrer de maneira gregária ou isolada. A maioria dos grupos em sínfita apresenta os dois tipos de alimentação, mesmo em espécies próximas que apresentam a mesma planta hospedeira, como é o caso de *Hemichroa alni*

(espécie solitária) e *Hemichroa crocea* (espécie gregária) (Heitland & Pschorn-Walcher, 1993).

O gregarismo larval encontrado em *D. diversipes* também está presente em outras espécies de Argidae, Diprionidae, Pergidae e Nematinae (Heitland & Pschorn-Walcher, 1993). As larvas que apresentam este comportamento em geral apresentam coloração aposemática e exibem movimentos coletivos de defesa, como elevar o abdômen num movimento rápido e expelir um líquido viscoso e repelente (Dias, 1975 e 1976; Heitland & Pschorn-Walcher, 1993; Costa & Louque, 2001).

Em *D. diversipes*, larvas de diferentes tamanhos se alimentam em um mesmo grupo, resultado da fragmentação e/ou fusão destes grupos, como decorrência da dispersão das larvas dentro e entre plantas hospedeiras. Segundo revisão realizada por Craig & Mopper (1993), a dispersão durante a fase larval é muito alta, encontrada em 6 das 10 espécies estudadas. Costa & Louque (2001) constataram que em *Neodiprion lecontei* os grupos de alimentação podem ser famílias simples, resultantes do acasalamento de uma fêmea e um macho, ou podem ser resultado da associação de larvas de diferentes grupos. Nas espécies neotropicais *Themos olfersii* (Dias, 1975) e *Dielocerus diasi* (Dias, 1976), as larvas também apresentam comportamento gregário, podendo ou não haver fusão dos grupos de alimentação, porém nestas espécies os grupos larvais não se deslocam de uma planta para outra, como ocorre em *D. diversipes*. Em *D. diasi*, os agregados encontrados nas árvores são formados por um número muito grande de indivíduos, sugerindo a presença de grupos larvais ovipositados por mais de uma fêmea (Dias, 1981).

Evidências como larvas marcadas de diferentes cores se alimentando juntas, número de casulos de um agregado maior do que o número médio de ovos encontrado no abdômen das fêmeas e baixo parentesco genético entre indivíduos emergidos de um mesmo agregado (discutido mais adiante) apontam que em *D. diversipes* um agregado é formado por larvas de diferentes posturas.

### 5.1.5 Capacidade Suporte do Hospedeiro

Os agregados de *Digelasinus diversipes* foram encontrados aderidos ao tronco da árvore hospedeira, assim como relatado por Penteado-Dias (1991), e não suspensos como sugerido por Costa-Lima (1960).

A correlação encontrada entre o tamanho dos agregados (medido através da área) e a planta hospedeira (medida através de seu diâmetro), mostra que árvores maiores são capazes de suportar um maior número de indivíduos. Uma vez que as larvas de *Digelasinus diversipes* se alimentam de maneira gregária e dispersiva, seria esperado que árvores maiores abrigassem um maior número de indivíduos em alimentação, decorrente inclusive de um maior número de posturas nestas árvores, e que agregados maiores fossem construídos junto a essas árvores.

Árvores maiores podem fornecer maior quantidade de alimento para as larvas, porém, não foi estabelecida uma correlação significativa entre o peso médio dos indivíduos e o tamanho da planta hospedeira. O comportamento das larvas de *D. diversipes* se dispersarem entre árvores vizinhas pode explicar este fato, uma vez que a alimentação das larvas não é dependente somente dos recursos da árvore hospedeira onde os ovos foram ovipositados.

Em himenópteros parasitóides, muitos estudos mostram que o tamanho do hospedeiro é fator importante no momento da oviposição, afetando a escolha do sexo da progênie (hospedeiros maiores são destinados à oviposição de fêmeas, enquanto que hospedeiros menores são destinados à oviposição de machos), uma vez que os recursos disponíveis para o desenvolvimento das larvas são dependentes deste fator. Acredita-se que, de maneira semelhante, as fêmeas de sínfita poderiam utilizar a alocação sexual como adaptação às condições ambientais, variações na qualidade da planta hospedeira, densidade populacional ou estrutura da população (Craig & Mopper, 1993). Por outro lado, para insetos fitófagos como no caso dos sínfitas, o tamanho da planta hospedeira é apenas um dos fatores que determinam a qualidade da planta.

Outros fatores seriam defensivos químicos, nutrição e crescimento do hospedeiro. Se qualquer um destes aspectos influencia o *fitness* do inseto, afetando diferencialmente machos e fêmeas, os parentais podem, então, ajustar a razão sexual da progênie (Craig & Mopper, 1993).

A ausência de correlação significativa entre a razão sexual e o tamanho da árvore hospedeira em *Digelasinus diversipes* pode ser explicada pela dispersão larval durante a alimentação. Assim, se houver alocação sexual baseada na qualidade da planta, ou seja, se em *Digelasinus diversipes* as fêmeas decidem o sexo da progênie no momento da oviposição dependendo das condições ambientais, o efeito desta escolha pode desaparecer no momento em que as larvas migram entre as árvores vizinhas, provavelmente, à procura de mais alimento, associando-se a outros grupos larvais, inclusive no momento da construção dos agregados.

## 5.2 Estrutura Genética Populacional

Os parâmetros de diversidade genética estimados neste trabalho (proporção de locos polimórficos, número médio de alelos, heterozigosidade intraloco e média) mostraram valores igualmente elevados nas três amostras analisadas. Dos 38 locos enzimáticos estudados, 16 apresentaram polimorfismo (*Est1*, *Est3*, *Est4* e *Est5*, *PepA*, *PepB* e *PepD*, *Icd*, *Mpi*, *Mdh*, *Pgm*, *Sod1*, *Acp1* e *Acp2*, *aGp1* e *aGp2*) o que representa 42% de locos polimórficos (critério 1%).

Uma vez que a proporção de locos polimórficos (P) e o número médio de alelos (A) são estimativas que pouco refletem a real variabilidade genética de uma população, apenas os níveis de heterozigosidade média foram utilizados para comparações estatísticas entre as espécies de Hymenoptera. Assim, para fins comparativos entre os dados da literatura e os obtidos no presente trabalho, apresentamos na Tabela 8 um valor médio da heterozigosidade média em Hymenoptera (Metcalf *et al.*, 1975; Wagner & Briscoe, 1983; Crespi, 1991; Owen *et al.*, 1992; Shoemaker *et al.*, 1992; Packer *et al.*, 1995; dados não publicados deste laboratório) e os valores já reportados para

Tabela 8 : Parâmetros genéticos utilizados para comparações neste trabalho.

Espécies	N <sup>o</sup> Locos Analisados	P <sup>a</sup>	A <sup>b</sup>	H <sup>c</sup>	Referi
Euura s-nodus	17	47	1,76	0,137	Sheppard & F
Euura	17	47	1,65	0,124	Sheppard & F
Schizocerella pilicornis	16	38	1,75	0,166	Sheppard & F
Diprion similis	15	8.7	1,1	0,032 ( $\pm 0,023$ )	Woods & Gt
Neodiprion ssp (7 espécies)	15	8.7	1,2	0,051 ( $\pm 0,028$ )	Woods & Gt
Neodiprion ssp (3 espécies)	45	28.9	1,25	0,048	Rosenmeier &
Cephalcia ssp (7 espécies)	28		1,76	0,197 (0,064)	Boato & B&
Digelasinus diversipes	38	42	1,43	0,094 (0,025)	este tr:
Symphyta				0,0756 (0,0011)	dados da l
Hymenoptera				0,0342 ( $\pm 0,0002$ )	dados da l

<sup>a</sup> proporção de locos polimórficos

<sup>b</sup> número médio de alelos por loco

<sup>c</sup> heterozigidade média

\* referências citadas em Discussão

Symphyta, bem como um valor médio de heterozigosidade média para este grupo (Graur, 1985; Sheppard & Heydon, 1986; Woods & Guttman, 1987; Rosenmeier & Packer, 1993; Boato & Battisti, 1996).

Os valores de heterozigosidade média observada nas três amostras analisadas não apresentaram diferenças significativas entre si (Bootstrap sobre locos, IC 95%, Efron, 1982 - Figura 21). O valor médio da heterozigosidade média de *D. diversipes* estimado neste trabalho não difere significativamente do valor médio da heterozigosidade para espécies de sínfita descritas na literatura, porém, é significativamente diferente da média estimada para outros himenópteros (Bootstrap sobre locos, IC 95%, Efron, 1982 - Figura 21).

Considerando o valor de heterozigosidade média observado para *D. diversipes*, um novo valor médio de heterozigosidade foi calculado para as espécies de sínfita ( $0,086 \pm 0,054$ ), o qual se mostrou significativamente diferente do valor encontrado para Hymenoptera (teste U unicaudal - Mann-Whitney Figura 21).

Algumas explicações têm sido propostas para os baixos níveis de variabilidade genética encontrados nos himenópteros. A haplodiploidia, característica intrínseca deste grupo, reduz o tamanho efetivo da população, aumenta a taxa de fixação dos alelos, dificulta a obtenção de um polimorfismo estável e aumenta a ligação gênica e o efeito carona devido aos menores níveis de recombinação presentes nos haplodiplóides (Crozier, 1971; Lester & Selander, 1979; Pamilo & Crozier, 1981; Avery, 1984; Owen, 1985). As peculiaridades comportamentais e ecológicas dos himenópteros também contribuem para a redução da variabilidade. Insetos sociais vivem em colônias onde apenas um ou poucos indivíduos são responsáveis pela reprodução, diminuindo assim o tamanho efetivo da população, e o potencial para a variabilidade genética (Pamilo *et al.*, 1978; Lester & Selander, 1979; Berkelhamer, 1983). Ainda, a estrutura física do ninho e alguns comportamentos dentro deste promovem o tamponamento das variações ambientais que poderiam ser

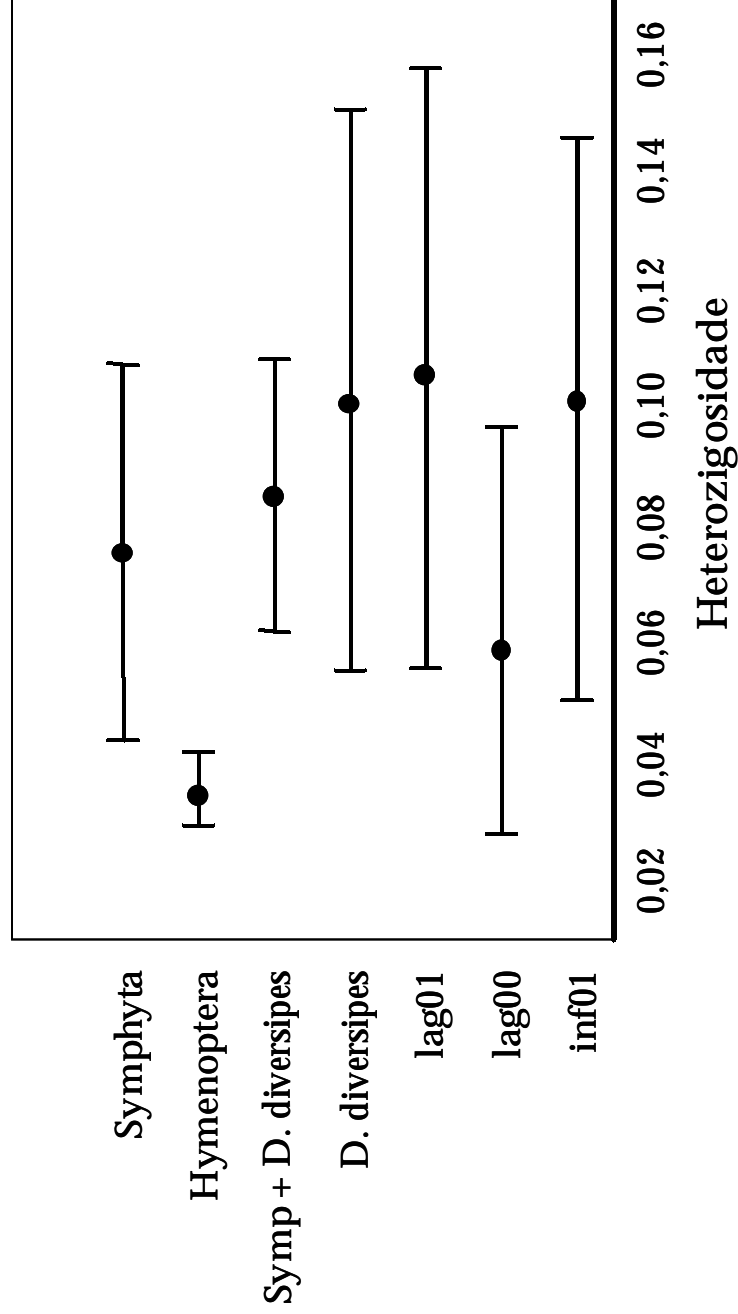


Figura 21: Comparação entre as heterozigosidades encontradas neste estudo com os dados presentes na literatura.



experimentadas pelos imaturos, e, de acordo com a hipótese da variação de nicho (Van Valen, 1965), a redução nas variações ambientais pode levar à redução na variação genética. Por fim, espécies parasitas freqüentemente experimentam o afinilamento em suas populações devido a mudanças na quantidade de hospedeiros, o que também pode levar à menor variabilidade genética neste grupo (Lester & Selander, 1979). No entanto, os níveis de heteroziguidade têm se mostrado distintos entre espécies de um mesmo estágio social (Owen, 1985) e o tamanho efetivo da população é influenciado, ainda, pela razão sexual (Crozier, 1976; Hedrick & Parker, 1997; Packer & Owen, 2001) e pelo sistema de acasalamento (Berkelhamer, 1983; Owen, 1985).

Os dados aqui apresentados mostraram altos níveis de heteroziguidade em Symphyta, assim como os encontrados por Sheppard & Heydon (1986), Rosenmeier & Packer (1993) e Boato & Batistti (1997). Estes dados sugerem, então, que a haplodiploidia *per se* não parece ser responsável pelos baixos níveis de variabilidade genética em Hymenoptera.

Os valores da estatística-F de Wright demonstraram que as amostras analisadas não são geneticamente homogêneas ( $F_{ST}=0,070$ ;  $\chi^2 = 458,862$ ;  $p<0,05$ ;  $GL=28$ ), indicando que esta população se encontra subdividida e que, portanto, não ocorre fluxo gênico significativo entre as subpopulações. As duas amostras coletadas em anos sucessivos na lagoa dos Patos (Lag00 e Lag01) também se mostraram heterogêneas geneticamente ( $F_{ST} = 0,025$ ;  $\chi^2 = 157,458$ ;  $p<0,05$ ,  $GL=14$ ). Este resultado pode ser justificado por uma distribuição espacialmente heterogênea das árvores de onde foram retirados os casulos nos dois anos consecutivos. A estatística-F revelou ainda que não há níveis significativos de endogamia dentro de amostras e na amostra total ( $F_{IS}=0,062$ ;  $\chi^2 = 29,828$ ;  $p<0,05$ ;  $GL=28$ ). Este resultado é corroborado pela não detecção de machos diplóides. Considerando o número de machos analisados e a probabilidade de um macho, sendo diplóide, ser heterozigoto para, pelo menos, um dos marcadores genéticos utilizados, a freqüência de machos diplóides nesta espécie não deve ser superior a 3%.

Em Hymenoptera, a haplodiploidia arrenótoca (onde os machos são haplóides e originários de ovos não fecundados, enquanto que as fêmeas são diplóides e originárias de ovos fecundados) parece ser a regra, embora algumas espécies apresentem partenogênese telítoca (onde ovos não fecundados dão origem a fêmeas). Machos diplóides causam problemas genéticos ao se acasalarem, portanto, na natureza não deve ser comum a ocorrência destes machos devido à baixa fertilidade, baixa viabilidade e aos altos custos que representam para as espécies. Porém, a presença de machos diplóides tem sido amplamente relatada, em diferentes espécies da ordem (33 espécies, segundo Cook, 1993), inclusive em *Neodiprion nigroscutum* e *Athalia rosae ruficornis*, ambos sínfitas (Smith & Wallace, 1971; Hung *et al.*, 1974; Chaud-Neto & Kerr, 1980; Camargo, 1982; Ross & Fletcher, 1985; Packer & Owen, 1990; Naito & Suzuki, 1991; Cook, 1993; Roubik *et al.*, 1996). Diferentes espécies desenvolveram mecanismos de eliminação destes machos, como por exemplo, o canibalismo larval destes machos e da rainha que os produziu pelas operárias e a expulsão do adulto da colônia.

Os modelos existentes para explicar os mecanismos de determinação do sexo em Hymenoptera seguem duas vertentes: balanço gênico e CSD (Complementary Sex Determination). De acordo com uma revisão feita por Cook (1993), o modelo CSD de loco único é, atualmente, o modelo que melhor se aplica a um maior número de espécies em Hymenoptera. Segundo este modelo, proposto por Whiting (1939 e 1943), o sexo é determinado por múltiplos alelos de um loco único, e os indivíduos heterozigotos se desenvolvem em fêmeas, enquanto que indivíduos hemi ou homozigotos se desenvolvem em machos. Uma das predições testáveis deste modelo é que a endogamia leva à maior homozigose dos alelos sexuais e, como conseqüência, a ocorrência de machos diplóides. É neste ponto que o modelo falha: em espécies parasitas, o endocruzamento é freqüente e quase obrigatório. No modelo CSD de locos múltiplos, proposto por Crozier (1971), a endogamia também acarreta

a produção de machos diplóides, porém, mais vagarosamente do que no modelo de loco único.

Embora não se possa excluir a possibilidade da ocorrência de mecanismos de eliminação no estágio larval dos machos diplóides produzidos, caso o modelo CSD responda pela determinação do sexo em *Digelasinus diversipes*, a não detecção de machos diplóides, portanto, reflete a baixa frequência de acasalamentos endogâmicos encontrados nesta espécie, verificados pelos coeficientes  $F_{IS}$  em cada amostra e na amostra total.

Os dendrogramas de distância genética ilustram, como esperado, que as diferenças genéticas entre as amostras das duas áreas são maiores que as observadas entre as amostras de uma mesma área em dois anos consecutivos. As distâncias genéticas (D) estimadas nas amostras da Lagoa dos Patos (Figuras 19) não foram suficientemente distintas para agrupar os agregados coletados nos dois anos consecutivos, apesar de ter sido encontrado estruturação entre as duas amostras. Por outro lado, os valores de D para as amostras coletadas em 2001 (Figura 20) foram capazes de agrupar em clusters diferentes os agregados provenientes das duas áreas de estudo, revelando uma baixa dispersão dos adultos desta espécie.

O parentesco médio estimado entre os indivíduos de um agregado foi baixo, evidenciando, juntamente com as observações de campo, que durante a alimentação as larvas de diferentes posturas se associam para formar os agregados, e que a dispersão larval pode ocorrer não só na mesma árvore onde foi realizada a postura, mas também entre árvores vizinhas.

## 6. Conclusão

---

Este estudo explorou alguns aspectos da biologia de *Digelasinus diversipes*, encontrados em duas áreas da Estação Ecológica do Jataí, Luís Antônio (SP). Esta espécie neotropical pertencente à Argidae apresenta uma geração por ano, e suas larvas se alimentam de maneira gregária em *Eugenia* cf. *glazioviana* Kiaersk. (Myrtaceae). Durante a alimentação, pode ocorrer a associação de diferentes grupos larvais, ou mesmo a fragmentação destes grupos. Os agregados são encontrados junto ao tronco da árvore hospedeira e larvas de diferentes posturas se associam para sua construção.

Os sistemas enzimáticos estudados neste trabalho revelaram altos níveis de polimorfismo em *Digelasinus diversipes*, comparáveis com a variabilidade genética encontrada em insetos diplodiplóides. Estes achados levam a crer que os baixos níveis de heterozigosidade encontrados em outros himenópteros não são consequência apenas do sistema de determinação de sexo haplodiplóide, característico destes insetos.

A população estudada se mostrou estruturada, sugerindo ausência de fluxo gênico significativo entre as amostras, o que leva a crer que esta espécie não se dispersa a grandes distâncias, corroborando os relatos da literatura. Os baixos níveis de endogamia e o baixo grau de parentesco encontrado constituem evidências de que os agregados são resultantes da postura de várias fêmeas.

Ao finalizar este trabalho, algumas considerações merecem ser feitas. O baixo grau de parentesco encontrado entre os indivíduos do agregado pode ser atribuído à associação das larvas para construção dos agregados; entretanto, o baixo parentesco pode ser reflexo também do sistema de acasalamento desta espécie. Esta questão poderia ser resolvida com observações em campo, captura da fêmea logo após o fim da oviposição e transferência das folhas onde a postura foi realizada para uma árvore controle. A retirada das folhas com oviposição poderia viabilizar o conhecimento da razão sexual

primária, com experimentos de quantificação de DNA por fluorocromos (como os realizados por Coleman *et al.*, 1981 e Coleman & Golf, 1985, em Craig & Mopper, 1993). Análises eletroforéticas adicionais, a partir das fêmeas que sabidamente realizaram posturas e de suas larvas, forneceria dados sobre o sistema de acasalamento único ou múltiplo da fêmea de *Digelasinus diversipes*. Um estudo sobre a distribuição das plantas hospedeiras e sobre a dispersão dos adultos traria maiores informações sobre a estrutura da população estudada. O estudo de parâmetros informativos sobre a qualidade das plantas hospedeiras poderia, juntamente com os experimentos de transferência dos ovos, ajudar nas questões sobre alocação sexual. Estas informações certamente contribuirão para a melhor compreensão da biologia e da estrutura genética das populações deste sínfita neotropical, abrindo caminhos para o estudo deste importante grupo de himenópteros por outros grupos de pesquisa do país.

## 7. Bibliografia

---

ANDERBRANT, O. 1993. Pheromone Biology of Sawflies. In: Wagner M and Raffa KF (eds) Sawfly life history adaptations to woody plants. Academic Press, New York, pp 119-156.

AVERY, P.J. 1984. The population genetics of haplo-diploid and x-linked genes. **Genet. Res.** 44: 321-341.

AVISE, J.C. 1974. Systematic value of electrophoretic data. **Syst. Zool.** 23: 465-481.

BAUMANN, R., SCHUBERT, R., HEITLAND, W., AUGER-ROZENBERG, M.A., FAIVRE-RIMPANT, P. & MÜLLER-STARCK, G. 2003. Genetic diversity within and among populations of *Diprion pini* (Hym., Diprionidae) determined by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction of haploid males. **J.Appl. Ent.** 127: 258-264.

BEAUDOIN, L., ALLAIS J.P. & GÉRI, C. 1997. Enzymatic polymorphism in natural populations of the sawfly *Diprion pini* L (Hymenoptera: Diprionidae). **Ann. Sci. For.** 54: 505-512.

BERKELHAMER, R.C. 1983. Intraspecific genetic variation and haplodiploidy, eusociality, and polygyny in the Hymenoptera. **Evolution** 37: 540-545

BOATO, A. & BATTISTI, A. 1996. High genetic variability despite haplodiploidy in primitive sawflies of the genus *Cephalcia* (Hymenoptera, Pampilidae). **Experientia** 52: 516-521.

CAMARGO, C.A. 1982. Longevity of diploid males, haploid males, and workers of the social bee *Melipona quadrifasciata*. **J. Kansas Entomol. Soc.** 55: 8-12.

CAVALLI-SFORZA, L.L. & EDWARDS, A.W.F. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. **Evolution** 21: 550-570.

CHARNOV, E.L. 1982. The theory of sex allocation. Princeton, 480p.

CHAUD-NETO, J. & KERR, W.E. 1980. Genetic mechanisms for the development of reproductive organs of *Apis mellifera* workers and diploid drones: a complementary hypothesis. **Braz. J. Genet.** 2: 127-138.

CODELLA, S.G. & RAFFA, K.F. 1993. Defensive strategies of folivorous sawflies. In: Wagner, M. & Raffa, K.F. (Eds). Sawfly life history adaptations to woody plants. Academic Press, New York, pp 261-294.

COOK, J.M. 1993. Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. **Heredity** 71: 421-435.

COSTA, J.T. & LOUQUE, R.W. 2001. Group foraging and trail following behavior of the Red-headed pine sawfly *Neodiprion lecontei* (Fitch) (Hymenoptera: Symphyta: Diprionidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.** 94: 480-489.

COSTA LIMA, A. 1937. Uma nova espécie de *Diapetimorpha* (Hymenoptera: Ichneumomoidea). **Mem. Inst. Osw. Cruz** 32: 539-541.

COSTA LIMA, A. 1960. Insetos do Brasil, 11° tomo, Hymenoptera. **Escola Nacional de Agronomia**, Série Didática, n. 13, Rio de Janeiro, 368 p.

CRAIG, C.L., HSU, M., KAPLAN, D. & PIERCE, N.E. 1999. A comparison of the composition of silk proteins produced by spiders and insects. **Int. J. Biol. Macromol.** 24: 109-118.

CRAIG, T.P. & MOPPER, S. 1993. Sex variation in sawflies. In: Wagner M and Raffa KF (eds). Sawfly life history adaptations to woody plants. Academic Press, New York, pp 61-93.

CRESPI, B.J. 1991. Heterozygosity in the haplodiploid Thysanoptera. **Evolution** 45: 458-464.

CROZIER, R.H. 1971. Heterozygosity and sex determination in haplodiploidy. **Am. Nat.** 105: 399-412.

CROZIER, R.H. 1976. Counter-intuitive property of effective population size. **Nature** 262: 384.

DALY, H.V., DOYEN, J.T. & PURCELL III, A.H. (Eds.) 1998. Introduction to insect biology and diversity. Oxford University Press, 680p.

DIAS, B.F.S. 1975. Comportamento pré-social de sínfitas do Brasil Central. I. *Themos olfersii* (Klug) (Hym., Argidae). **Studia Ent.** 18: 401- 432.

DIAS, B.F.S. 1976. Comportamento pré-social de sínfitas do Brasil Central. I. *Dielocerus diasii* Smith, 1975 (Hym., Argidae). **Studia Ent.** 19: 461- 501.

DIAS, B.F.S. 1981. Behaviour and ecology of two neotropical presocial sawflies, *Dielocerus diasii* Smith and *Themos olfersii* (Klug) (Hymenoptera, Symphyta, Argidae). PhD Thesis, University of Edinburg.



EFRON, B. 1982. The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. CBMS-NSF Regional Conference Series in Applied Mathematics, Monograph 38, SIAM, Philadelphia.

EMERY, E.O. 1998. Determinantes da distribuição espacial de *Dielocerus diasi* Smith (Hymenoptera, Symphyta, Argidae) em populações de *Sclerolobium paniculatum* Vogel (Leguminosae, Caesalpinioidea). Tese de Mestrado. Universidade de Brasília.

EVANS, H.E. & WEST-EBERHARD, M.J. (Eds.) 1970. The wasps. University of Michigan Press. Ann Arbor, 265p.

FISHER, R.A. 1930. The genetical theory of natural selection. Clarendon Press. Oxford, 230p.

FLANDERS, S.E. 1956. The mechanisms of sex-ratio regulation in the (Parasitic) Hymenoptera. **Insect soc.**, p. 325-334.

GAULD, I. & BOLTON, B. (Eds.) 1996. The Hymenoptera. (2nd ed.) Oxford University Press. London, 839 p.

GODFRAY, H.C.J., HASSELL, M.P. & HOLT, R.D. 1994. The population-dynamic consequences of phenological asynchrony between parasitoids and their hosts. **J. Anim. Ecol.** 63: 1-10.

GOULET, H. & HUBER, J.T. (Eds.) 1993. Hymenoptera of the world: an identification guide to families. Agriculture Canada. Ottawa, 753p.

GRAUR, D. 1985. Gene diversity in Hymenoptera. **Evolution** 39: 190-199.

- HAMILTON, W.D. 1967. Extraordinary sex ratios. **Science** 156: 477-488.
- HANSON, P.E. & GAULD, I. (Eds.) 1995. The Hymenoptera of Costa Rica. New York, Oxford University Press, 893p.
- HARRIS, H. & HOPKINSON, D. A., 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North-Holland Publishing Co.
- HEITLAND, W. & PSCHORN-WALCHER, H. 1993. Feeding strategies of sawflies. In: Wagner, M. & Raffa, K.F. (Eds). Sawfly life history adaptations to woody plants. Academic Press, New York, pp 94-118.
- HEDRICK, P.W. & PACKER, J.D. 1997. Evolutionary genetics and genetic variation of haplodiploids and x-linked genes. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** 28: 55-83.
- HOPKINSON, D.A., MESTRINER, C.J. & HARRIS, H. 1973. Esterase D: a new human polymorphism. **Ann. Hum. Genet.** 37:119-137.
- HUNG, A.C.F., VINSON, S.B. & SUMMERLIN, J.W. 1974. Male sterility in the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. **Ann. Ent. Soc. Am.** 67: 909-912.
- HUNT, J.H. 1999. Trait mapping and salience in the evolution of eusocial vespid wasps. **Evolution** 53: 225-237.
- KING, B.H. 1987. Offspring sex-ratios in parasitoid wasps. **Quart. Rev.Biol.** 62: 367-396.
- KNERER, G. 1993. Life History Diversity in Sawflies. In: Wagner M and Raffa KF (eds) Sawfly life history adaptations to woody plants. Academic Press, New York, pp 33-60.

LESTER, L.J. & SELANDER, R.K. 1979. Population genetics of haplodiploid insects. **Genetics** 92: 1329-1345.

MARQUES, L.A., 1933. Tenthridinidae conhecida por <<mosca-de-serra>>, cuja larva, ou <<falsa-lagarta>> é nociva a várias espécies do gênero *Tibouchina* (Biologia de *Bergiana cyanocephala* (Klug, 1824) Konow, 1899). **Bol. Inst. Biol. Def. Agric.**, Rio de Janeiro, 25p.

METCALF, R. A., MARLIN, J. C. & WHITT, G. S., 1975. Low levels of genetic heterozygosity in Hymenoptera. **Nature** 257: 792-794.

MONTE, O. 1946. Falsas-Lagartas. **Chac e Qui** 79: 591.

MOPPER, S., CRAIG, T.G. & PRICE, P.T. 1990. Plant phenotype and interspecific competition between insects determine sawfly performance and density. **Ecology** 71: 2135-2144.

MOPPER, S. & WHITHAM, T.G. 1992. The plant stress paradox: effects on pinyon sawfly sex ratios and fecundity. **Ecology** 73: 515-525.

NAITO, T. & SUZUKI, H. 1991. Sex determination in the sawfly, *Athalia rosae ruficornis* (Hymenoptera): Occurrence of triploid males. **J. Hered.** 82: 101-104.

NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. **Am. Nat.** 106: 282-292.

NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics** 89: 580-590.

NEI, M. & ROYCHOUDHURY, A.K. 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. **Genetics** 76: 379-390.

ODE P.J. & HEINZ, K.M. 2002. Host-size-dependent sex ratio theory and improving mass-reared parasitoid sex ratios. **Biol. Control** 24: 31-41.

OISHI, K., SAWA, M., HATAKEYAMA, M. & KAGEYAMA, Y., 1993. Genetics and biology of the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera). **Genetica** 88: 119-127.

ÖSTRAND, F. & ANDERBRANT, O. 2001. Mating duration and frequency in a pine sawfly. **J. Insect Behav.** 14: 595-606.

OWEN, R.E. 1985. Difficulties with the interpretation of patterns of genetic variation in the eusocial Hymenoptera. **Evolution** 39: 201-205.

OWEN, R.E., MYDZYNSKI, J.L., PACKER, L. & MCCORQUODALE, D.B. 1992. Allozyme variation in bumble bees (Hymenoptera: Apidae). **Biochem. Genet.** 30: 443-453.

PACKER, L. & OWEN, R.E. 1990. Allozyme variation, linkage disequilibrium and diploid male production in a primitively eusocial bee *Augochlora striata* (Hymenoptera: Halictidae). **Heredity** 65: 241-248.

PACKER, L. & OWEN, R.E. 2001. Population genetic aspects of pollinator decline. **Conserv. Ecol.** 5: 1-35.

PACKER, L., DZINAS, A., STRICKLER, K. & SCOTT, V. 1995. Genetic differentiation between two host "races" and two species of cleptoparasitic bees and their hosts. **Biochem. Genet.** 33: 97-109.

PAMILO, P. & CROZIER, R.H. 1981. Genetic variation in male haploids under deterministic selection. **Genetics** 98: 199-214.

PAMILO, P., VARVIO-AHO, S.L. & PEKKARINEN, A. 1978. Low enzyme gene variability in Hymenoptera as a consequence of haplodiploidy. **Hereditas** 88: 93-99.

PENTEADO-DIAS, A.M. 1991. Himenópteros parasitóides associados a ninhos de *Digelasinus diversipes* (Kirby, 1882) (Hymenoptera, Argidae). **Revta Bras Ent** 35: 545-548.

QUELLER, D.C. & GOODNIGHT, K.F. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. **Evolution** 43(2): 258-275.

REEVE, H.K., REEVE, J.S. & PFENNIG, D.W. 1985. Eusociality and genetic variability: a re-evaluation. **Evolution** 39: 200-201.

ROSENMEIR, L. & PACKER, L., 1993. A comparison of genetic variation in two sibling species pairs of haplodiploid insects. **Biochem. Genet.** 31: 185-200.

ROSS, K.G. & FLETCHER, D.J.C. 1985. Genetic origin of male diploidy in the first ant, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae), and its evolutionary significance. **Evolution** 39: 888-903.

ROUBIK, D.W., WEIGT, L.A. & BONILLA, M.A. Populations genetics, diploid males, and limits to social evolution of Euglossine bees. **Evolution** 50: 931-935.

SHEPPARD, W.S. & HEYDON, S.L. 1986. High levels of genetic variability in three male-haploid species. **Evolution** 40: 1350-1353.

SHOEMAKER, D.D., COSTA, J.T. & KENNETH, G.R. 1992. Estimates of heterozygosity in two social insects using a large number of electrophoretic markers. **Heredity** 69: 573-582.

SMITH, D.R. 1992. A synopsis of the sawflies (Hymenoptera: Symphyta) of America south of the United States: Argidae. **Mem. Am. Entomol. Soc.** 39, 201 pp.

SMITH, D.R. 1993. Systematics, life history, and distribution of sawflies. In: Wagner, M. & Raffa, K.F. (Eds). Sawfly life history adaptations to woody plants. Academic Press, New York, pp 3-32.

SMITH, D.R. 1995. The sawflies and woodwasps. In The Hymenoptera of Costa Rica. Hanson, P. & Gauld, I. (Eds.) 1995.

SMITH, S.G. & WALLACE, D.R. 1971. Allelic sex determination in a lower hymenopteran, *Neodiprion nigroscutum* Midd. **Can.J. Genet. Cytol.** 13: 617-621.

SMITHIES, O. 1955. On electrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal human adults. **Biochem. J.** 61: 620-641.

SNYDER, T.P. 1975. Lack of allozymic variability in three bee species. **Evolution** 28: 687-689.

SWOFFORD, D.L. & SELANDER, R.B. 1989. Biosys-1. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Release 1.7. Swofford, DL, Illinois Nat. Hist. Survey, 43 p.

TRIVERS, R.L., HARE, H. 1976. Haplodiploidy and the evolution of the social insects. **Science** 191: 249-263.

VAN VALEN, L. 1965. Morphological variation and width of ecological niche. **Am. Nat.** 99: 377-390.

WAGNER, A.E. & BRISCOE, D.A. 1983. An absence of enzyme variability within two species of *Trigona* (Hymenoptera). **Heredity** 50: 97-103.

WHITING, P.W. 1943. Multiple alleles in complementary sex determination of *Habrobracon*. **Genetics** 28: 365-382.

WHITING, P.W. 1945. The evolution of male haploidy. **Quart. Rev.Biol.** 20: 231-260.

WILSON, E.O. (Eds.) 1971. The insect societies. The Belknap Press. Cambridge, 548p.

WOODS, P.E. & GUTTMAN, S.I. 1987. Genetic variation in *Neodiprion* (Hymenoptera: Symphyta: Diprionidae) sawflies and a comment on low levels of genetic diversity within the Hymenoptera. **Ann. Entomol. Soc. Am.** 80: 590-599.