

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Filogeografia molecular de *Thyrintaina arnobia* (Lepidoptera:  
Geometridae) e *Gonipterus* spp. (Coleoptera: Curculionidae) no  
Brasil**

**Frederico Nanini Souza Sato**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração:  
Entomologia

**Piracicaba  
2021**

**Frederico Nanini Souza Sato**  
**Bacharel em Engenharia Agrônoma**

**Filogeografia molecular de *Thyriniteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) e  
*Gonipterus* spp. (Coleoptera: Curculionidae) no Brasil**  
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:  
Prof. Dr. **ALBERTO SOARES CORRÊA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração:  
Entomologia

**Piracicaba**  
**2021**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**  
**DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Sato, Frederico Nanini Souza

Filogeografia molecular de *Thyrineina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) e *Gonipterus* spp. (Coleoptera: Curculionidae) no Brasil / Frederico Nanini Souza Sato. -- versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

82 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Lagarta-parda-do-eucalipto 2. Gorgulho-do-eucalipto 3. Marcador mitocondrial 4. Demografia 5. Identificação molecular I. Título

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Alberto Soares Corrêa pelo apoio, orientação, pelos conselhos e pela amizade durante os seis anos que trabalhamos juntos. Agradeço imensamente pela confiança depositada em mim, e por ter me proporcionado participar de projetos paralelos que com certeza estão impulsionando minha carreira acadêmica.

À Universidade de São Paulo (USP), em especial à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) por ter me provido a oportunidade de aprender, crescer e me formar um profissional.

À grande equipe do Laboratório de Ecologia Molecular de Artrópodes da ESALQ - USP (ENTOMOL) e “agregados” por terem me fornecido um lugar ao qual cresci profissionalmente e fiz boas amizades: Alan Saldanha (“Alandin”), Ana Wengrat (“AhazAna”), André Charkani (“O > Estagiário do Mundo”), Cleane Souza (“Clê-Clê”), Cristina Marquesini (“Kika”), Daniela Maggio (“Dani”), Davi Fernandes (“Davizera”), Denise Alves (“Dê”), Eduardo Shimbori, Erick Cordeiro, Fábio Araújo, Felipe Carmezini (“Felipôncios”), Frederico Hickmann (“Fred”), Larissa Muniz (“Larilene”), Laura Pantoja, Lucas Ardiani (“Bettyinha”), Maria Gabriela, Mateus Aurélio (“Fofinho”), Renato Horikoshi, Rosely Souza (“Rosely Suely Sucury da Sylva”), Sarah Garcia (“Absoluta”), Tamara Moraes (“Gata jogada do frescobol”), Victória Rossetti (“Mozones”).

Ao Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, funcionários, colegas e professores que me ensinaram tanto no mestrado.

À empresa Suzano SA pelo suporte logístico e financeiro na realização do projeto, à Klabin e ao IPEF (Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais) pelo auxílio nas coletas dos insetos utilizados nesse trabalho.

À minha família, em especial minha mãe, irmãos e amigos (Lulili, Andore-kun e Dener) pelo suporte e incentivo, mesmo separados pela distância.

E a todos aqueles que participaram direta ou indiretamente na minha vida influenciando positivamente para que eu chegasse onde estou hoje.

Meu genuíno muito obrigado.

## EPÍGRAFE

“São as nossas escolhas que revelam o que realmente somos, muito mais do que as nossas qualidades”

*Alvo Dumbledore - Harry Potter e a Câmara Secreta*

고생 끝에 낙이 온다. – **No final das dificuldades vem a felicidade.**  
(Provérbio coreano)

## SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT .....	8
1. INTRODUÇÃO .....	9
REFERÊNCIAS.....	17
2. FILOGEOGRAFIA MOLECULAR DE <i>Thyriniteina arnobia</i> (STOLL, 1782) (LEPIDOPTERA: GEOMETRIDAE) NO BRASIL.....	25
RESUMO.....	25
ABSTRACT .....	26
2.1. INTRODUÇÃO.....	26
2.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	29
2.2.1. Áreas de coleta e extração de DNA .....	29
2.2.2. Amplificação e sequenciamento do COI .....	30
2.2.3. Análise dos dados.....	31
2.3. RESULTADOS.....	33
2.3.1. Análises de diversidade e estrutura demográfica de <i>T. arnobia</i> .....	33
2.4. DISCUSSÃO .....	37
REFERÊNCIAS.....	40
3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E DEMOGRAFIA DE <i>Gonipterus platensis</i> E <i>G. pulverulentus</i> (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) NO BRASIL.....	47
RESUMO.....	47
ABSTRACT .....	48
3.1. INTRODUÇÃO.....	49
3.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	51
3.2.1. Coleta de insetos e extração de DNA .....	51
3.2.2. Amplificação e sequenciamento do COI .....	53
3.2.3. Identificação molecular.....	54
3.2.4. Construção de primers específicos para identificação das espécies <i>Gonipterus</i> presentes no Brasil .....	54

3.2.5. Diversidade e demografia molecular de <i>G. platensis</i> no Brasil.....	55
3.3. RESULTADOS .....	56
3.3.1. Identificação molecular de <i>Gonipterus</i> spp. no Brasil .....	56
3.3.2. Marcador espécie específico para <i>G. platensis</i> e <i>G. pulverulentus</i> e sua distribuição no Brasil.....	59
3.3.3. Análise de diversidade, estrutura e demografia.....	60
3.4. DISCUSSÃO .....	64
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
APÊNDICES .....	79

## RESUMO

### Filogeografia molecular de *Thyriniteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) e *Gonipterus* spp. (Coleoptera: Curculionidae) no Brasil

A introdução do eucalipto (*Eucalyptus* spp.) no território brasileiro, e sua expansão territorial favoreceu o desenvolvimento de desfolhadores nativos de mirtáceas, e criou condições de estabelecimento para pragas exóticas introduzidas pelo homem, como são os casos da praga nativa *Thyriniteina arnobia* e das espécies crípticas e exóticas *Gonipterus platensis* e *G. pulverulentus*, respectivamente. Hoje, essas espécies são importantes pragas desfolhadoras do eucalipto no Brasil. A relação entre o eucalipto e essas espécies-praga já perduram por várias décadas, nos levando a perguntar quais são os padrões atuais de estruturação genética e demográfica dessas espécies no Brasil. Dessa forma, os objetivos desse trabalho foram: (i) estudar a diversidade, estruturação genética e demografia de *T. arnobia* e *Gonipterus* spp. no Brasil; e (ii) identificar molecularmente as espécies de *Gonipterus* spp. coletadas e construir marcadores moleculares espécies-específicos para uma rápida e precisa identificação das espécies de *Gonipterus* presentes no Brasil. Para isso, sequenciou-se um fragmento do DNA mitocondrial, mais especificamente um fragmento do gene citocromo oxidase c subunidade I (COI), dos indivíduos coletados. Os resultados de diversidade e estruturação genética mostraram que as populações de *T. arnobia* e *G. platensis* possuem moderada diversidade genética e alta estruturação por região geográfica, principalmente em *T. arnobia*, onde as populações do Nordeste do Brasil possuem altos índices de variância molecular em relação as populações da Região Centro-Sul. A espécie *G. pulverulentus* não apresentou diversidade genética, e não foi incluída nas análises populacionais. As populações de *T. arnobia* e *G. platensis* não estão expansão/retração demográfica, mas encontram-se em expansão espacial no Brasil. O marcador específico desenvolvido para identificação de *G. platensis* e *G. pulverulentus* foi baseado na utilização de primers espécie-específicos e permitiram com sucesso identificar essas espécies crípticas por meio de PCR multiplex e posterior visualização do resultado em gel de agarose. A distribuição atual de *G. pulverulentus* está restrita ao Sul do país, enquanto *G. platensis* está amplamente distribuída nas demais regiões brasileiras.

Palavras-chave: Lagarta-parda-do-eucalipto, Gorgulho-do-eucalipto, Marcador mitocondrial, Demografia, Identificação molecular



## ABSTRACT

### **Molecular phylogeography of *Thyrintina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) and *Gonipterus* spp. (Coleoptera: Curculionidae) in Brazil**

The introduction of eucalyptus (*Eucalyptus* spp.) in the Brazilian territory and its territorial expansion enhanced the development of native Myrtaceae pests and created conditions of establishment for exotic pests introduced by man, as are the cases of the native pest *Thyrintina arnobia* and the cryptic and exotic species *Gonipterus platensis* and *G. pulverulentus*, respectively. Today, these species are important defoliating pests of eucalyptus in Brazil. The relationship between eucalyptus and these pest species has persisted for several decades, leading us to ask about the current genetic and demographic structuring of these species in Brazil. Therefore, this work's objectives were: (i) to study the diversity, genetic structure, and demography of *T. arnobia* and *Gonipterus* spp. in Brazil. In addition (ii) to realize the molecular identifications of *Gonipterus* spp. and build species-specific molecular markers for quick and accurate identification of two *Gonipterus* species present in Brazil. For this, a fragment of the mitochondrial DNA was sequenced, specifically a fragment of the cytochrome oxidase gene and subunit I (COI), from the collected specimens. The results of diversity and genetic structure showed that *T. arnobia* and *G. platensis* populations have moderate genetic diversity and high structure by geographic region, mainly in *T. arnobia*, where populations in the Northeast of Brazil have high rates of molecular variance to the populations of the Center-South Region. The species *G. pulverulentus* did not present genetic diversity and was not included in the population analyses. *T. arnobia* and *G. platensis* are not demographic expanding/retracting. Still, they are in spatial expansion in Brazil. The specific marker developed for identifying *G. platensis* and *G. pulverulentus* was based on the use of species-specific primers and successfully allowed the identification of these cryptic species through a multiplex PCR and subsequent visualization of the results on an agarose gel. The current distribution of *G. pulverulentus* is restricted to the South of the country, while *G. platensis* is widely distributed in the Brazilian regions.

**Keywords:** Eucalyptus brown looper, Eucalyptus snout beetle, Mitochondrial marker, Demography, Molecular identification

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil é um dos modelos internacionais no progresso da silvicultura, devido ao esforço e dedicação de profissionais, empresas, universidades e pesquisa associadas à área florestal. Neste cenário, a eucaliptocultura brasileira se destaca, produzindo a principal matéria prima para a produção industrial de celulose, papel, painéis de madeira, pisos laminados, carvão vegetal e de madeira serrada.

Em 2019, a área total plantada de eucalipto no Brasil totalizou 6,97 milhões de hectares, com produtividade média de 35,3 m<sup>3</sup>/ha/ano, valores que são frutos da adesão de boas práticas de manejo, investimento em melhoramento genético além das condições climáticas e de solo intrínsecas ao país (IBÁ, 2020). Essas circunstâncias conferem ao Brasil, o reconhecimento de ser o país com o menor período entre o plantio e colheita do mundo de eucalipto, e o de melhor produtividade (IBÁ, 2017, 2018, 2019, 2020).

Dentre os fins industriais das árvores plantadas no Brasil, a principal produção é a de celulose, conferindo ao Brasil a posição de segundo maior produtor mundial desse produto. No ano de 2019, foram produzidas 19,7 milhões de toneladas de celulose, registrando uma queda de 6,6% em relação ao ano de 2018 principalmente pela adoção de estratégias mercadológicas para esperar por melhores oportunidades no balanço entre oferta e procura do produto. Do total produzido, aproximadamente 75% foi exportado (14,7 milhões de toneladas) (IBÁ, 2020).

Já para a produção de papel, o Brasil ocupa o décimo lugar na produção mundial com produção de 10,5 milhões de toneladas em 2019, onde 80% da produção foi designada ao mercado externo. Quanto à produção de mundial de painéis de madeira, o Brasil em 2019 se destacou na oitava posição. Outros setores relevantes da indústria florestal são os setores de produção de carvão vegetal e de madeira serrada, onde o Brasil ocupa as posições de primeiro e nono lugares para a produção mundial respectivamente (IBÁ, 2020). Em todos esses destaques, a eucaliptocultura possui impactos positivos para o desenvolvimento econômico, social e ambiental.

Mesmo com todo o progresso alcançado ao longo dos anos em termos de melhoramento genético, mecanização de plantios, programas de fertilidade de solo,

nutrição de plantas, entre outros avanços da eucaliptocultura no Brasil, ainda existe um déficit na bibliografia quando se diz respeito ao âmbito florestal brasileiro (MARSCHALEK, 2000). E ainda que existam perdas de produtividade em sistemas florestais ocasionadas pelo ataque de pragas, a área da entomologia florestal recebe pouca atenção e carece de mais pesquisas e publicações no país.

As áreas de produção florestal proporcionam alta disponibilidade de recursos para muitas espécies da entomofauna. Esses locais, permitem o estabelecimento de espécies, que muitas vezes, acabam tornando-se pragas. A introdução do eucalipto (*Eucalyptus* spp.) no território brasileiro, e sua expansão territorial, como cultura florestal, para suprir as demandas de fontes energéticas e de indústrias de papel e celulose (SANTOS et al., 2000; ZANUNCIO et al., 1989), fez com que espécies que se alimentavam de mirtáceas nativas, passassem a explorar as plantas de eucalipto como nova fonte de alimento (ZANUNCIO et al., 1989). Além disso, ao longo dos anos muitas pragas exóticas, do local de origem geográfica do eucalipto, foram acidentalmente introduzidas no território brasileiro (SCHÜHLI et al., 2016; WILCKEN et al., 2003, 2010).

Várias são as espécies de insetos associadas ao eucalipto, ZANUNCIO et al. (1991) reporta cerca de 300 espécies, entretanto, apenas uma pequena porcentagem (10%) causa danos econômicos relevantes aos viveiros de mudas, às plantas adultas e ao produto final. Dentre os insetos herbívoros associados ao eucalipto ao redor do mundo, podemos dizer que os principais são pertencentes às ordens Coleoptera (Curculionidae, Buprestidae, Cerambycidae, Chrysomelidae, Scarabaeidae); Phasmatodea (Phasmatidae); Hymenoptera (Formicidae, Eulophidae, Pergidae); Lepidoptera (Geometridae, Anthelidae, Bombycidae, Cosmopterigidae, Cossidae, Erebidae, Gracillariidae, Hepialidae, Incurvariidae, Lasiocampidae, Limacodidae, Lycaenidae, Mimallonidae, Nepticulidae, Noctuidae, Nolidae, Notodontidae, Psychidae, Riodinidae, Saturniidae); Hemiptera (Cicadellidae, Coreidae, Eriococcidae, Psyllidae, Thaumastocoridae); Orthoptera (Gryllidae, Gryllotalpidae) e Blattodea (Rhinotermitidae, Termitidae) (BERTI FILHO et al., 2015; BURKS et al., 2015; OHMART & EDWARDS, 1991; SILVA et al., 2014; WILCKEN et al., 2010).

*Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) é considerada hoje o principal lepidóptero desfolhador de eucalipto (ANJOS, 1987; WILCKEN, 1996) sendo encontrada em quase todas as áreas plantadas com essa cultura. *T.*

*arnobia* também é conhecida popularmente como lagarta-parda-do-eucalipto, lagarta-de-cor-parda ou lagarta-medea-palmo. É uma espécie nativa da América do Sul com ampla distribuição nesse continente e em parte da América Central (ANJOS, 1987). De acordo com SCOBLE (1999) a espécie *T. arnobia* possui cinco subespécies: *T. arnobia arnobia* (Stoll, 1782), *T. arnobia phala* (Rindge, 1961), *T. arnobia picta* (Rindge, 1969), *T. arnobia quadricostaria* (Herrich-Schäffer, 1870) e *T. arnobia tephra* (Rindge, 1969), sendo que apenas a subespécie *T. arnobia arnobia* é relatada no Brasil (RINDGE, 1961).

Atualmente, *T. arnobia* está presente em todas as regiões brasileiras, reportada em vários hospedeiros nativos como: congonha-do-sertão [*Citronella gongonha* (Icacinaceae)]; gabioba [*Campomanesia* spp. (Myrtaceae)]; pitangueira e cagaiteira [*Eugenia* spp. (Myrtaceae)]; goiabeiras e araçás [*Psidium* spp. (Myrtaceae)]; erva-mate [*Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae)]; pau-terra [*Qualea* sp. (Vochysiaceae)]; tinguí [*Magonia pubescens* (Sapindaceae)]; murici [*Byrsonima* sp. (Malpighiaceae)]; assa-peixe [*Vernonanthura* sp. (Asteraceae)]; e angico-cangalha [*Peltophorum* sp. (Fabaceae)]. Os hospedeiros exóticos pertencem à família Myrtaceae e compreendem várias espécies de eucaliptos destacando-se: *Eucalyptus alba*, *E. tereticornis*, *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. saligna* e *Corymbia citriodora* (ANJOS, 1987; ZANUNCIO, 1993; SANTOS et al., 2000; SCHUMACHER & VIERA, 2015). *T. arnobia* também já foi relatada como praga do café conilon [*Coffea* sp. (Rubiaceae)] (FORNAZIER et al., 2017) e em laranjeira [*Citrus* sp. (Rutaceae)] (PEREIRA, 2007). Como essa espécie de lepidóptero presumivelmente se originou nos hospedeiros nativos, danos econômicos expressivos e surtos populacionais não ocorrem neles. Circunstância oposta se sucede nas espécies de eucalipto. HOLTZ et al. (2003a) justificaram esse comportamento pela falta de mecanismos de defesa desenvolvidos nas espécies exóticas em relação às nativas, corroborando com outros trabalhos que citam a importância dessa espécie como o lepidóptero-praga mais importante para a cultura do eucalipto (MOREIRA et al., 2013; PERES FILHO & BERTI FILHO, 2003; SOARES et al., 2009).

As mariposas de *T. arnobia* apresentam dimorfismo sexual onde as fêmeas são maiores que os machos, possuem antenas filiformes e asas esbranquiçadas. Os machos, menores do que as fêmeas, possuem antenas bipectinadas e coloração amarronzada. O ciclo de vida dessa espécie difere de acordo com o hospedeiro em que se desenvolve, levando aproximadamente 54 dias para se completar (HOLTZ et

al., 2003a). O período larval é o mais longo das fases (cerca de 26 dias), onde as lagartas passam por seis instares. Casualmente, as fêmeas podem apresentar sete instares e os machos cinco, todavia, a duração total do estágio larval não é influenciada (ANJOS, 1987; HOLTZ et al., 2003a,b; OLIVEIRA et al., 2005). O acasalamento e a postura ocorrem em uma só vez durante o período noturno, onde as massas de ovos são depositadas nos ramos finos das plantas. O número de ovos varia, podendo ultrapassar 1000 ovos por fêmea. As lagartas eclodem e iniciam sua alimentação da base para o topo das árvores e das margens para os interiores das parcelas florestais (OLIVEIRA et al., 2005; ZANUNCIO, 1993).

O controle de *T. arnobia* nos eucaliptais brasileiros é realizado por diferentes métodos, se destacando o controle químico e o biológico. No controle químico, hoje são registrados três inseticidas cada um pertencente aos seguintes grupos químicos: piretróide, benzoiluréia e diacilhidrazina (AGROFIT, 2020). O controle biológico se destaca pelo uso de organismos entomopatogênicos com destaque para a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner) vendido sobre a forma de produtos microbiológicos. Recentemente, HORTA et al. (2018) revelaram um vírus (TharCPV-14) com características potenciais para o uso como biopesticida de *T. arnobia*. Alguns inimigos naturais também já foram relatados efetuando o controle de *T. arnobia*, mas seu uso ainda é pontual, como os parasitoides *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae), *Apanteles* sp. (Hymenoptera: Braconidae), *Tetrastichus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae), *Brachymeria* spp. (Hymenoptera: Chalcididae), algumas espécies de dípteros da família Tachinidae, e predadores da espécie *Podisus* spp. (Hemiptera: Pentatomidae) (CAMILO et al., 2015; ZANUNCIO, 1993;). Outros produtos também já foram testados e demonstraram potencial controle de *T. arnobia*, como o inibidor de proteases berenil, causando atividade proteolítica sobre enzimas digestivas no intestino das lagartas, ação repelente e fago-inibidora (MARINHO-PRADO et al., 2012). Todavia, o cenário atual é bem diferente, com empresas produzindo, comercializando e liberando a campo alguns parasitoides e predadores.

Entre os coleópteros desfolhadores do eucalipto presentes no Brasil, destaca-se o curculionídeo conhecido como gorgulho-do-eucalipto. Atualmente, duas espécies desse gorgulho estão presentes no território brasileiro: *Gonipterus platensis* (Marelli, 1926) e *G. pulverulentus* Lea, 1897, conhecidas até 2012 como *G. scutellatus* e *G. gibberus*, respectivamente. A nomenclatura atual foi aderida a partir de um estudo molecular que elucidou por meio de análises filogenéticas e

morfológicas que *G. scutellatus* compreende em um grupo monofilético de oito espécies crípticas (MAPONDERA et al., 2012).

Ao contrário de *Thyrinteina* spp. as duas espécies de *Gonipterus* spp. presentes hoje no Brasil são exóticas originadas da Austrália, sendo *G. platensis* uma das pragas do eucalipto com maior distribuição global (SOUZA et al., 2016), ocorrendo em todos os continentes nas seguintes localidades: Oceania (Austrália e Nova Zelândia); Ásia (China); Europa (Itália, França, Portugal e Espanha); África (Quênia, Lesoto, Madagascar, Malawi, Ilhas Maurício, Moçambique, África do Sul, Santa Helena, Suazilândia, Uganda e Zimbábue) e Américas (Estados Unidos, Argentina, Brasil, Chile e Uruguai) (EPPO, 2005). No Brasil, essa espécie já foi reportada causando danos em plantios de eucalipto nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Espírito Santo (WILCKEN & OLIVEIRA, 2015). *G. pulverulentus*, além de sua região de origem (Austrália) está presente hoje apenas na América do Sul, em três países: Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), Argentina, e Uruguai (EPPO, 2005).

Das espécies de *Eucalyptus* spp. atacadas por *Gonipterus* spp. são citadas principalmente, *E. camadulensis*, *E. dunii*, *E. globulus*, *E. grandis*, *E. maidenii*, *E. punctata*, *E. robusta*, *E. rostrata*, *E. saligna*, *E. smithii*, *E. urginera*, *E. viminalis*, no híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*, entre outras (EPPO, 2005; SOUZA et al., 2016). Os principais danos causados hábito alimentar de *Gonipterus* spp. nas fases de larva e de adulto são: perda de área foliar (desfolha), deixando as folhas com aspecto serrado; crescimento epicórmico (quebra de dormência de gemas presentes na casca do tronco das plantas) e atrofiamento de ramos, causando perda de crescimento com surgimento de árvores com aspecto de chifres-de-veado ou vassouras-de-bruxa; e grupo de brotos mortos (LANFRANCO & DUNGEY, 2001; TOOKE, 1955). A fase larval é responsável pela maioria dos danos causados nos plantios de eucalipto, alimentando-se unicamente de folhas jovens do ápice das árvores. Larvas de terceiro instar conseguem causar a desfolha completa dos ponteiros das plantas, deixando apenas as nervuras centrais das folhas (SOUZA et al., 2016). As projeções de perdas de produção por redução de crescimento podem chegar de 20 a 80 % por um período de 10 anos de crescimento (REIS et al., 2012).

Na fase adulta, a morfologia externa de *G. platensis* e *G. pulverulentus* é bem similar, se diferenciando principalmente pela coloração do tegumento, onde *G. pulverulentus* possui coloração castanho-clara à escura, escamas curtas e presença

de uma faixa oblíquo-transversal na porção mediana do corpo com escamas mais claras e alongadas e *G. platensis* possui coloração de escamas castanho-escuro. Outra característica que se distingue entre as duas espécies é a forma do tubérculo umeral, sendo forte, subcônico e de ápice arredondado em *G. pulverulentus*, e pouco proeminente em *G. platensis*. As outras características de diferenciação encontram-se nas genitálias das espécies (ROSADO-NETO & MARQUES, 1996). As larvas são facilmente distinguíveis pela presença de três faixas longitudinais escuras no abdome de *G. platensis*, o que não ocorre em *G. pulverulentus* (ROSADO-NETO & MARQUES, 1996; SOUZA et al., 2016). O ciclo de desenvolvimento (larva-adulto) de *Gonipterus* spp., é variável de acordo com a temperatura e o hospedeiro, podendo levar  $47,2 \pm 0,9$  dias a  $75,1 \pm 2,06$  dias em *E. urophylla* e *E. grandis*, respectivamente sob uma temperatura de 26 °C, fotofase de 13h e escotofase de 11h (OLIVEIRA, 2006).

As principais táticas de controle de *Gonipterus* spp. utilizadas hoje no Brasil compreendem basicamente na resistência de plantas, com plantio de espécies e clones de eucalipto menos preferidas pelos insetos, tática essa que é pouco eficiente; no controle biológico com a utilização do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*; e a utilização do parasitoide de ovos *Anaphes nitens* (Girault, 1928) (Hymenoptera: Mymaridae) que foi introduzido no país juntamente com a praga (BERTI FILHO et al., 1992; SANTOLAMAZZA-CARBONE et al., 2004). No presente, não existe nenhum produto químico registrado para o controle de *Gonipterus* spp. no Brasil (AGROFIT, 2020). Existem estudos recentes e promissores para o uso de nematoides entomopatogênicos no controle de *G. platensis* nas fases de pré-pupa e pupa em campos de eucaliptos do Brasil, como os nematoides *Steinernema diaprepesi* e *S. brazilense* (Rhabditida: Steinernematidae) (BRIDA et al., 2020; DAMASCENA et al., 2020).

Apesar de *G. pulverulentus* já ter sido reportado no Brasil desde a década de 1920 (como *G. gibberus*), *G. platensis* desde 1979 (como *G. scutellatus*) e *T. arnobia* ser uma espécie nativa do continente sul-americano (ANJOS, 1987; WILCKEN et al., 2008;), até hoje, essas espécies não foram alvo de estudos moleculares no Brasil.. Estas ferramentas viabilizaram a caracterização de fenômenos muitas vezes complicados de se mensurar por metodologias tradicionais, como: taxa de endogamia, estrutura populacional, dispersão de espécies, fluxo gênico, entre outros (CHOUPINA & MARTINS, 2015; FREELAND, 2011; SINGH et

al., 2017). Ademais, parte dos avanços provenientes de estudos ecológicos ocorreram devido à implementação de marcadores moleculares em estudos ecológicos nas últimas décadas.

Marcadores moleculares baseados no genoma mitocondrial são bastante utilizados em estudos filogeográficos em animais, incluindo em insetos, por possuírem características essenciais para um bom marcador molecular tais como: ausência de recombinação, alta variação intraespecífica, herança materna, facilidade de replicação dos resultados (AVISE, 2000; CORRÊA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2013; MANDAL et al., 2014).

A maioria das espécies possuem algum nível de desconformidade na frequência gênica entre suas populações distribuídas em diferentes regiões geográficas. Essas diferenças são originadas pelo equilíbrio entre os processos evolutivos que fixam determinados alelos localmente, como a deriva genética, que ocorre aleatoriamente e a seleção natural que causa adaptações locais. Em contrapartida a esses processos, o fluxo gênico provoca o oposto, ou seja, diminui a diversidade genética entre as populações pela troca de alelos entre os indivíduos. O fluxo gênico entre populações pode ser mensurado diretamente, mediante observações, ou indiretamente, onde o fluxo gênico é inferido através dos dados de frequências alélicas, distâncias genéticas, e índice de fixação ( $F_{ST}$ ). A técnica de medição direta permite a avaliação atual do fluxo, enquanto os métodos indiretos possuem a vantagem de apontar eventos de fluxo entre as populações em um passado recente (SLATKIN, 1987).

Trabalhos sobre variabilidade intraespecífica permitem a categorização de linhagens, raças e haplótipos, além de definir a estruturação de populações geograficamente distribuídas que permitem inferir quais são as forças evolutivas que moldaram as populações de uma espécie na paisagem (SLATKIN, 1993). Como reportado para a espécie *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae), onde há uma alta estruturação genética entre as populações do Sul e Norte do Brasil, caracterizando a presença de duas linhagens e refutando a hipótese de que *E. heros* migrou para regiões mais ao norte do Brasil junto com os cultivos da soja (SOARES et al., 2018). Os autores ainda descreveram que a colonização dos cultivos de soja foi realizada por populações locais que posteriormente expandiram demograficamente devido à grande disponibilidade de recurso. Além disso, estudos filogeográficos são básicos para determinar as rotas de introduções de espécies



exóticas como foi recentemente descrito para *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae), *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) e *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) (CORDEIRO et al., 2019; GONÇALVES et al., 2019; PANTOJA-GOMEZ et al., 2019; SANTOS et al., 2021).

Dessa forma, o objetivo geral é investigar a diversidade genética, demografia, estruturação genética de populações de *Thyrintina arnobia* e *Gonipterus* spp. coletadas em plantios de eucalipto provenientes de diferentes regiões produtoras no Brasil. Para isso, utilizaram-se marcadores moleculares baseados no sequenciamento de um gene mitocondrial, gerando uma filogeografia das espécies. Resumidamente, filogeografia pode ser definida como o estudo da distribuição geográfica dos grupos filogenéticos intraespecíficos. E as análises filogeográficas permitem a dedução de sobretudo três circunstâncias: (i) as populações separadas geograficamente ocupam ramos distintos em uma árvore filogenética, caracterizando baixo fluxo gênico; (ii) populações separadas geograficamente ocupam ramos próximos ou conectados, o que é sinal de alta taxa de dispersão da espécie, e conseqüentemente de fluxo gênico entre as populações; ou (iii) grupos monofiléticos separados por uma grande distância, indicando cessão do fluxo gênico entre as populações por um grande período de tempo e possível separação de linhagens (AVISE et al., 1987).

A filogeografia está intimamente relacionada à demografia, viabilizando o entendimento de processos da história de vida das populações, como oscilações no tamanho populacional, conectividade entre populações (fluxo gênico), colonizações de novos ambientes, entre outros. Esses processos demográficos estão associados aos processos ecológicos e evolutivos, e as diferenças/semelhanças, genéticas interpopulacionais são os vestígios deixados por eles (LOWE et al., 2017). Todas essas informações são inéditas e poderão elucidar o padrão de diversidade de duas importantíssimas pragas do cenário de produção de eucalipto no Brasil (*T. arnobia* e *Gonipterus* spp.), tornando possível melhores tomadas de decisões para o manejo integrado de pragas para essas duas espécies.

## REFERÊNCIAS

- AGROFIT (2020). Consulta de Produtos Formulados.
- ANJOS, N. (1987). A lagarta-parda, *Thyriniteina arnobia* Stoll, 1782 (Lepidoptera: Geometridae) desfolhadora de eucaliptos. In EPAMIG, editor, *EPAMIG*, volume Boletim Técnico, 56 p. Belo Horizonte.
- AVISE, J. C. (2000). Phylogeography — The History and Formation of Species. *Heredity*, 85(2):201.
- AVISE, J. C., ARNOLD, J., BALL, R. M., BERMINGHAM, E., LAMB, T., NEIGEL, J. E., REEB, C. A., e SAUNDERS, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18(1):489–522.
- BERTI FILHO, E., ALVES, S. B., CERIGNONI, J. A., e STAPE, J. L. (1992). Ocorrência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em adultos de *Gonipterus scutellatus* (Gyllenhal) (Coleoptera: Curculionidae). *Revista de Agricultura*, 67(3):251–252.
- BERTI FILHO, E., COSTA, V. A., e LASALLE, J. (2015). Primeiro registro de vespa-da-galha, *Epichrysocaris burwelli* (Hymenoptera: Eulophidae) em *Corymbia (Eucalyptus) citriodora* (Myrtaceae) no Brasil. *Brazilian Journal of Agriculture - Revista de Agricultura*, 79(3):363.
- BRIDA, A. L., CANDELARIA, M. C., CASTRO, B. M. C., LEITE, L. G., WILCKEN, S. R. S., ZANUNCIO, J. C., e WILCKEN, C. F. (2020). Pathogenicity of *Steinernema brazilense* (Rhabditida: Steinernematidae) to *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) prepupae. *Brazilian Journal of Biology*.
- BURKS, R. A., MOTTERN, J. L., WATERWORTH, R., e PAINE, T. D. (2015). First report of the Eucalyptus gall wasp, *Ophelimus maskelli* (Hymenoptera: Eulophidae), an invasive pest on Eucalyptus, from the Western Hemisphere. *Zootaxa*, 3926(3):448.
- CAMILO, S. d. S., SORAES, M. A., ZANUNCIO, J. C., LEITE, G. L. D., PIRES, E. M., e DA CRUZ, M. D. C. M. (2015). Plantas hospedeiras de *Thyriniteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) afetam o desenvolvimento do parasitoide *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). *Revista Árvore*, 39(1):159–166.

- CHOUPINA, A. B. e MARTINS, I. M. (2015). Molecular markers for genetic diversity, gene flow and genetic population structure of freshwater mussel species. *Brazilian Journal of Biology*, 74(3 suppl 1):s167–s170.
- CORDEIRO, E. M. G., SOARES, P. L., ALVES, D. A., E CORRÊA, A. S. (2019). Updating the saga of the small hive beetle (*Aethina tumida*): molecular inference of the origin of the South American invasion. *Apidologie*, 50(3), 273-276.
- CORRÊA, A., VINSON, C., BRAGA, L., GUEDES, R., e OLIVEIRA, L. (2017). Ancient origin and recent range expansion of the maize weevil *Sitophilus zeamais*, and its genealogical relationship to the rice weevil *S. oryzae*. *Bulletin of Entomological Research*, 107(1):9–20.
- DAMASCENA, A. P., CARVALHO, V. R., RIBEIRO, M. F., HORTA, A. B., MONTEIRO DE CASTRO E CASTRO, B., ZANUNCIO, A. J. V., WILCKEN, C. F., ZANUNCIO, J. C., e WILCKEN, S. R. S. (2020). *Steinernema diaprepesi* (Rhabditida: Steinernematidae) parasitizing *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae). *Royal Society Open Science*, 7(8):200282.
- EPPO (2005). *Gonipterus gibberus* and *Gonipterus scutellatus*. *EPPO Bulletin*, 35(3):368– 370.
- FORNAZIER, M., MARTINS, D., FANTON, C., e BENASSI, V. (2017). Manejo de Pragas do Café Conilon, 2017. In FERRÃO, R. G., DA FONSECA, A. F. A., FERRÃO, M. A. G., e DE MUNER, L. H., editors, Café Conilon, chapter 17, pages 399–433. Incaper, 2ª edition.
- FREELAND, J. (2011). *Molecular ecology*. Oxford Wiley-Blackwell Hoboken, NJ, Oxford Hoboken, NJ, 2nd edition.
- GONÇALVES, R. M., MASTRANGELO, T., RODRIGUES, J. C. V., PAULO, D. F., OMOTO, C., CORRÊA, A. S., & DE AZEREDO-ESPIN, A. M. L. (2019). Invasion origin, rapid population expansion, and the lack of genetic structure of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) in the Americas. *Ecology and Evolution*, 9(13), 7378-7401.
- HOLTZ, A. M., de OLIVEIRA, H. G., PALLINI, A., VENZON, M., ZANUNCIO, J. C., OLIVEIRA, C. L., MARINHO, J. S., e ROSADO, M. d. C. (2003a). Desempenho de *Thyrintina arnobia* Stoll (Lepidoptera: Geometridae) em eucalipto e goiaba: o hospedeiro nativo não é um bom hospedeiro? *Neotropical Entomology*, 32(3):427–431.

- HOLTZ, A. M., ZANUNCIO, J. C., OLIVEIRA, H. G., PALLINI, A., MARINHO, J. S., OLIVEIRA, C. L., e PINON, T. B. M. (2003b). Aspectos biológicos de *Thyrintea arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) provenientes de lagartas criadas em folhas de *Eucalyptus cloeziana* ou de *Psidium guajava* sob condições de campo. *Revista Árvore*, 27(6):897–901.
- HORTA, A. B., ARDISSON-ARAUJO, D. M. P., da SILVA, L. A., de MELO, F. L., da SILVA MORGADO, F., FRANCO LEMOS, M. V., RIBEIRO, Z. A., BOIÇA, A. L., WILCKEN, C. F., e RIBEIRO, B. M. (2018). Genomic analysis of a cypovirus isolated from the eucalyptus brown looper, *Thyrintea arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae). *Virus Research*, 253(March):62–67.
- IBÁ (2017). Relatório 2017 - Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ). Technical report.
- IBÁ (2018). Relatório 2018 - Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ). Technical report.
- IBÁ (2019). Relatório 2019 - Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ). Technical report.
- IBÁ (2020). Relatório anual 2020 - Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ). Technical report.
- LANFRANCO, D. e DUNGEY, H. S. (2001). Insect damage in eucalyptus: A review of plantations in Chile. *Austral Ecology*, 26(5):477–481.
- LOWE, W. H., KOVACH, R. P., e ALLENDORF, F. W. (2017). Population genetics and demography unite ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 32(2):141–152.
- MANDAL, S. D., CHHAKCHHUAK, L., GURUSUBRAMANIAN, G., e KUMAR, N. S. (2014). Mitochondrial markers for identification and phylogenetic studies in insects – A Review. *DNA Barcodes*, 2(1):1-9.
- MAPONDERA, T. S., BURGESS, T., MATSUKI, M., e OBERPRIELER, R. G. (2012). Identification and molecular phylogenetics of the cryptic species of the *Gonipterus scutellatus* complex (Coleoptera: Curculionidae: Gonipterini). *Australian Journal of Entomology*, 51(3):175–188.
- MARINHO-PRADO, J. S., LOURENÇÃO, A. L., GUEDES, R. N., PALLINI, A., OLIVEIRA, J. A., e OLIVEIRA, M. G. (2012). Enzymatic response of the eucalypt defoliator *Thyrintea arnobia* (Stoll) (Lepidoptera: Geometridae) to a bis-benzamidine proteinase inhibitor. *Neotropical Entomology*, 41(5):420–425.
- MARSCHALEK, R. (2000). Resistência genética a insetos em espécies florestais revisão sobre o gênero *Eucalyptus*. Editora da FURB, Blumenau.

- MOREIRA, J. A., NEPPE, T., DE PAIVA, M. M., DEOBALD, A. M., BATISTA-PEREIRA, L. G., PAIXÃO, M. W., e CORRÊA, A. G. (2013). Studies towards the identification of the sex pheromone of *Thyrinteina arnobia*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24(12):1933–1941.
- OHMART, C. P. e EDWARDS, P. B. (1991). Insect Herbivory on Eucalyptus. *Annual Review of Entomology*, 36:637–657.
- OLIVEIRA, H. N., ZANUNCIO, J. C., PEDRUZZI, E. P., e ESPINDULA, M. C. (2005). Rearing of *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) on guava and eucalyptus in laboratory. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(5):801–806.
- OLIVEIRA, N. C. (2006). Biologia de *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera: Curculionidae) em *Eucalyptus* spp. em diferentes temperaturas. Tese, Universidade Estadual Paulista UNESP, Botucatu.
- OLIVEIRA, M. R. C., CORRÊA, A. S., DE SOUZA, G. A., GUEDES, R. N. C., e OLIVEIRA, L. O. (2013). Mesoamerican origin and pre-and post-Columbian expansions of the ranges of *Acanthoscelides obtectus* Say, a cosmopolitan insect pest of the common bean. *PLoS One*, 8(7), e70039.
- PANTOJA-GOMEZ, L. M., CORRÊA, A. S., DE OLIVEIRA, L. O., e GUEDES, R. N. C. (2019). Common origin of Brazilian and Colombian populations of the neotropical coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Journal of Economic Entomology*, 112(2), 924-931.
- PEREIRA, Luciane Gomes Batista (2007). A Lagarta-Parda, *Thyrinteina arnobia*, principal lepidóptero desfolhador da cultura do eucalipto. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais CETEC. Dossiê Técnico - Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas, 28p.
- PERES FILHO, O. e BERTI FILHO, E. (2003). Exigências térmicas de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) e efeitos da temperatura na sua biologia. *Ciência Florestal*, 13(2):143–151.
- REIS, A. R., FERREIRA, L., TOMÉ, M., ARAUJO, C., e BRANCO, M. (2012). Efficiency of biological control of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) by *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) in cold areas of the Iberian Peninsula: Implications for defoliation and wood production in *Eucalyptus globulus*. *Forest Ecology and Management*, 270:216–222.

- RINDGE, F. H. (1961). A revision of the Nacophorini (Lepidoptera, Geometridae). *Bulletin of Entomological Research*, 123(2):91–153.
- ROSADO-NETO, G. H. e MARQUES, M. I. (1996). Características do adulto, genitália e formas imaturas de *Gonipterus gibberus* Boisduval e *G. scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera, Curculionidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 13(1):77–90.
- SANTOLAMAZZA-CARBONE, S., RODRÍGUEZ-ILLAMOLA, A., e RIVERA, A. C. (2004). Host finding and host discrimination ability in *Anaphes nitens* Girault, an egg parasitoid of the *Eucalyptus* snout-beetle *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal. *Biological Control*, 29(1):24–33.
- SANTOS, G. P., ZANUNCIO, T. V., e ZANUNCIO, J. C. (2000). Desenvolvimento de *Thyriniteina arnobia* Stoll (Lepidoptera: Geometridae) em folhas de *Eucalyptus urophylla* e *Psidium guajava*. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 29(1):13–22.
- SANTOS, F. A., CORREA, A. S., NANINI, F., NASCIMENTO, D. A., JUNQUEIRA, L. R., & WILCKEN, C. F. (2021). Genetic diversity of *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) and its parasitoid *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) in Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 81(3): 838-841.
- SCHÜHLI, G. S. e., PENTEADO, S. C., BARBOSA, L. R., REIS FILHO, W., e IEDE, E. T. (2016). A review of the introduced forest pests in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(5):397–406.
- SCHUMACHER, M. V. e VIERA, M. (2015). *Silvicultura do Eucalipto no Brasil*. Editora UFSM, Santa Maria - RS, 1 edition.
- SCOBLE, M. J. (1999). *Geometrid moths of the world a catalogue: (Lepidoptera, Geometridae)*. Collingwood, VIC CSIRO Stenstrup, Denmark Apollo Books, Collingwood, VIC Stenstrup, Denmark.
- SILVA, L. H., UKAN, D., MANAGÓ, B. L., e MIRANDA, L. (2014). *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae): nova praga do eucalipto no Brasil. *Enciclopédia Biosfera*, 10(18):2083–2098.
- SINGH, S., MISHRA, V., e BHOI, T. K. (2017). Insect molecular markers and its utility: a review. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 10(4):469.
- SLATKIN, M. (1987). Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. *Science*, 236(4803):787–792.

- SLATKIN, M. (1993). Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*, 47(1):264.
- SOARES, M. A., ZANUNCIO, J. C., LEITE, G. L. D., WERMELINGER, E. D., e E, S. J. (2009). Does *Thyriniteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) use different defense behaviours against predators? *Journal of Plant Disease and Protection*, 116(1):30–33.
- SOARES, P. L., CORDEIRO, E. M. G., SANTOS, F. N. S., OMOTO, C., e CORREA, A. S. (2018). The reunion of two lineages of the Neotropical brown stink bug on soybean lands in the heart of Brazil. *Scientific Reports*, 8(1):2496.
- SOUZA, N. M., JUNQUEIRA, L. R., WILCKEN, C. F., SOLIMAN, E. P., de CAMARGO, M. B., NICKELE, M. A., e BARBOSA, L. R. (2016). Ressurgência de uma antiga ameaça: Gorgulho do Eucalipto *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae). *Circular Técnica IPEF*, 209:01–20.
- TOOKE, F. G. C. (1955). The Eucalyptus Snout-Beetle, *Gonipterus scutellatus* Gyll: A Study of its Ecology and Control by Biological Means. Department of Agriculture, SA (1):1–282.
- WILCKEN, C., SOLIMAN, E., de SÁ, L., BARBOSA, L., RIBEIRO DIAS, T., FERREIRA-FILHO, P., e RODRIGUES OLIVEIRA, R. (2010). Bronze Bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on Eucalyptus in Brazil and its Distribution. *Journal of Plant Protection Research*, 50(2):201–205.
- WILCKEN, C. F. (1996). Biologia de *Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) em espécies de *Eucalyptus* e em dieta artificial. PhD thesis, USP - ESALQ, Piracicaba.
- WILCKEN, C. F., do COUTO, E. B., ORLATO, C., FERREIRA FILHO, P. J., e FIRMINO, D. C. (2003). Ocorrência do psilídeo-de-concha (*Glycaspis brimblecombei*) (Hemiptera: Psyllidae) em florestas de eucalipto no Brasil. *Circular Técnica IPEF*, n. 201.
- WILCKEN, C. F., e OLIVEIRA, N. C. (2015). Gorgulho-do-eucalipto *Gonipterus platensis* Marelli In: VILLELA, E. F., e ZUCCHI, R. A. *Pragas introduzidas no Brasil: Insetos e Ácaros*. Piracicaba: FEALQ, 779-791.
- WILCKEN, C. F., SARTORIO, R., LOUREIRO, E., BEZERRA JUNIOR, N., e ROSADO NETO, G. (2008). Ocorrência de *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal

- (Coleoptera: Curculionidae) em plantações de eucalipto no estado do Espírito Santo. *Arquivos do Instituto Biológico*, 75(1):113–115.
- ZANUNCIO, J. C. (1993). Lepidoptera desfolhadora de eucalipto biologia, ecologia e controle. *Piracicaba IPEF SIF*, Piracicaba.
- ZANUNCIO, J. C., PEREIRA, J. M. M., ZANUNCIO, T. V., e NASCIMENTO, E. C. (1991). Aspectos biológicos de *Blera varana* (Lepidoptera: Notodontidae), desfolhador de eucalipto. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 20(1):35–43.
- ZANUNCIO, J. C., SANTOS, G. P., SARTÓRIO, R. C., DOS ANJOS, N., e MARTINS, L. C. C. (1989). Levantamento e flutuação populacional de lepidópteros associados à eucaliptocultura. *Ipef*, (41/42):77–82.





## 2. FILOGEOGRAFIA MOLECULAR DE *Thyrintaina arnobia* (STOLL, 1782) (LEPIDOPTERA: GEOMETRIDAE) NO BRASIL

### RESUMO

Este estudo analisa a diversidade genética e história demográfica de *Thyrintaina arnobia*, o principal lepidóptero-praga desfolhador do eucalipto no Brasil, utilizando um marcador molecular de DNA mitocondrial (mtDNA). Amostras provenientes de sete populações de áreas produtoras de eucalipto no Brasil foram coletadas para o sequenciamento de um fragmento do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI). Os índices de diversidade apresentaram resultados baixos de diversidade nucleotídica e medianos de diversidade haplotípica. Mediante Análise de Variância Molecular (AMOVA), os resultados revelaram uma alta estruturação populacional geográfica entre as populações do Nordeste e Centro-Sul do país. Os testes  $F_s$  de Fu e D de Tajima não tiveram valores significativos, refutando a hipótese de expansão demográfica recente ou eventos de seleção para as populações de *T. arnobia*. A conformação da rede de haplótipos foi coerente com os resultados de neutralidade, pois não apresentou a conformação característica de populações em expansão demográfica, que é caracterizada por um haplótipo central frequente e vários haplótipos raros menos frequentes. Os testes de *mismatch distribution* sugerem expansão espacial das populações de *T. arnobia*, principalmente das populações localizadas no Nordeste brasileiro. As principais hipóteses para a expansão espacial são devidas à recente expansão da eucaliptocultura para os estados da Região Nordeste do Brasil, quando comparada ao tempo de plantios de eucalipto presentes nas Regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul, e pela menor quantidade de hospedeiros nativos na Região Nordeste em relação aos encontrados no Grupo Centro-Oeste. A abundância de recurso provocada pelas extensas áreas de eucalipto pode favorecer a expansão espacial das populações de *T. arnobia*. Para confirmação esses resultados recomenda-se a adição de outros marcadores moleculares neutros do genoma mitocondrial e nuclear, a fim de que haja uma melhor perspectiva sobre os padrões demográficos e de diversidade de *T. arnobia*. No contexto de Manejo Integrado de Pragas, a adoção de estratégias e táticas de controle devem ser consideradas a partir de uma perspectiva regional/local devido ao baixo fluxo de alelos entre as regiões brasileiras.

**Palavras-chave:** lagarta-parda-do-eucalipto; genética de população; demografia; citocromo c oxidase subunidade I.

## MOLECULAR PHYLOGEOGRAPHY OF *Thyrinteina arnobia* (STOLL, 1782) (LEPIDOPTERA: GEOMETRIDAE) IN BRAZIL

### ABSTRACT

This study analyzes the genetic diversity and demographic history of *Thyrinteina arnobia*, the main lepidopteran eucalyptus defoliator, using a molecular marker of mitochondrial DNA (mtDNA). Samples from seven populations of eucalyptus-producing areas in Brazil have collected for the sequencing of a fragment of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene. The molecular diversity indices presented low results of nucleotide diversity and median results of haplotypic diversity. Through the Analysis of Molecular Variance (AMOVA), the results revealed a high geographic population structure among the populations of the Northeast and Center-South of Brazil. The Fu's  $F_s$  and Tajima's  $D$  tests did not show significant values, refuting the hypothesis of recent demographic expansion for the populations. The form of the haplotype network was consistent with the neutrality results, as it did not present the characteristic shape of populations in demographic expansion, which is characterized by a frequent central haplotype and several less frequent rare haplotypes. The mismatch distribution tests suggest a spatial expansion of the populations of *T. arnobia*, mainly those located in the Northeast of Brazil. The main hypotheses for spatial expansion are due to the recent expansion of eucalyptus culture to the states of the Northeast Region of Brazil when compared to the time of eucalyptus plantations present in the Southeast, Midwest, and South Regions, and by the smaller number of native hosts in the Northeast Region in relation to those found in the Midwest Group. The abundance of resources caused by the extensive areas of eucalyptus may favor the spatial expansion of the populations of *T. arnobia*. For these results, it is recommended to add other neutral molecular markers from the mitochondrial and nuclear genomes, in order to have a better perspective on the demographic and diversity patterns of *T. arnobia*. In the context of Integrated Pest Management, the adoption of control strategies and tactics should be considered from a regional/local perspective due to the low flow of alleles between Brazilian regions.

**Keywords:** eucalyptus brown looper; population genetics; demography; cytochrome c oxidase subunit I.

### 2.1. INTRODUÇÃO

Plantas do gênero *Eucalyptus* (Myrtaceae) nativas da Austrália foram introduzidas no Brasil em virtude de seu elevado potencial de produção em madeira (QUEIROZ & BARRICHELO, 2007). O aumento da comercialização brasileira de

produtos florestais cresceu bastante nos últimos anos, provocando uma inevitável exigência para o aumento da produtividade do setor florestal brasileiro, e, portanto, do eucalipto. A produção da celulose, por exemplo, passou de 15,1 milhões de toneladas em 2013 para 21,1 milhões de toneladas em 2018, permitindo o Brasil alcançar o status de segundo maior produtor mundial dessa commodity (IBÁ, 2014, 2020).

Apesar do esforço para o crescimento e expansão do eucalipto no Brasil, a eucaliptocultura ainda sofre ataque de pragas e doenças. Uma das pragas responsáveis pela redução da produtividade na cultura do eucalipto é conhecida como lagarta-parda-do-eucalipto: *Thyrntaina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) (ALFENAS et al., 2009). Com ocorrência em praticamente toda a América do Sul, sua região de origem, e parte da América Central (ANJOS, 1987), *T. arnobia* encontrou no eucalipto um hospedeiro vulnerável, com poucos mecanismos de defesa, e passou a ser o principal lepidóptero desfolhador dessa cultura (OLIVEIRA et al., 2005). Como as regiões de origem da praga e do eucalipto são distintas, acredita-se que não houve um processo de coevolução entre essas duas espécies, assim como aconteceu com seus hospedeiros originais, e talvez, isso justifique a susceptibilidade do eucalipto ao ataque dessa praga (HOLTZ et al., 2003). Antes da chegada do eucalipto, *T. arnobia* se alimentava de vários outros hospedeiros, com preferência por plantas da família Myrtaceae (ZANUNCIO et al., 1991).

O principal dano causado por *T. arnobia* às plantas do eucalipto é a desfolha, que varia conforme a severidade do ataque. Normalmente, o ataque dessa praga ocorre em surtos populacionais, e é percebido quando a maior parte das lagartas já chegaram ao quinto instar, onde o consumo foliar aumenta (BERTI FILHO, 1974). Em um estudo realizado por ODA & BERTI FILHO (1978), averiguou-se que plantios de *Eucalyptus saligna* com 2,5 a 3,5 anos podem sofrer uma redução de 25,6 m<sup>3</sup>/ha na produção do volume médio de madeira em áreas com 100 % de desfolha causada por *T. arnobia*.

Apesar da grande importância da espécie *T. arnobia* para a área florestal, e de existir mais de 70 anos da sua relação com eucalipto (BERTI FILHO, 1974), ainda existe uma carência sobre informações da diversidade genética e estrutura populacional dessa praga nas diferentes regiões brasileiras. Dessa forma, a filogeografia vem como uma ferramenta capaz de explorar aspectos da diversidade

das espécies, cada vez mais sendo utilizada na entomologia. Possibilitando averiguar os padrões locais de dispersão, fluxo gênico, estruturação populacional e distribuição espacial dos genótipos dos organismos estudados, ampliando o entendimento sobre processos evolutivos e gerando novas perspectivas para o manejo integrado de pragas (CORREA et al., 2019; FRESIA et al., 2013; PERETOLCHINA et al., 2018; SILVA et al., 2020; SOARES et al., 2018; STRÖHER et al., 2019).

O grau de estruturação populacional varia conforme as taxas de fluxo gênico entre as populações presentes em uma determinada área geográfica, podendo formar: (i) uma grande população de baixa estrutura genética, onde ocorre alta taxa de cruzamento entre os indivíduos distribuídos por uma extensa área; (ii) várias populações bem estruturadas, gerando populações independentes que não realizam troca de material genético ao longo de uma faixa geográfica; ou (iii) uma metapopulação, caracterizada como um estado intermediário entre os cenários i e ii, sendo formada por um agrupamento de populações locais com baixa taxa de fluxo gênico com outro(s) agrupamento(s) de populações, ou seja, uma população constituída de populações (VAN NOUHUYS, 2016). Regiões com características climáticas e de paisagem diferentes podem interferir na variabilidade intraespecífica, imprimindo barreiras às trocas de material genético entre populações. Geralmente, populações mais distantes geograficamente também possuirão maiores diferenças genéticas (CORDEIRO et al., 2020; GOUDARZI et al., 2019; MÖLLER et al., 1996).

Populações isoladas tendem a fixar alelos localmente, elevando as desconformidades entre essas populações. Os principais processos evolutivos que determinam as variações intraespecíficas, são a seleção natural, que provoca adaptações locais e a deriva genética, que altera as frequências gênicas após a ocorrência de eventos estocásticos. Esses dois processos funcionam de maneira oposta ao fluxo gênico que tende a homogeneizar os alelos presentes entre as populações (AVISE et al., 1987; MASIER & BONTE, 2020).

Logo, os nossos objetivos para esse capítulo foram: (i) avaliar a diversidade genética e os eventos demográficos que moldaram a atual distribuição das populações de *T. arnobia* nas principais áreas de produção de eucalipto no Brasil; e (ii) investigar a estrutura genética entre as populações de *T. arnobia* inferidos a partir do marcador molecular baseado no sequenciamento de um fragmento do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI).

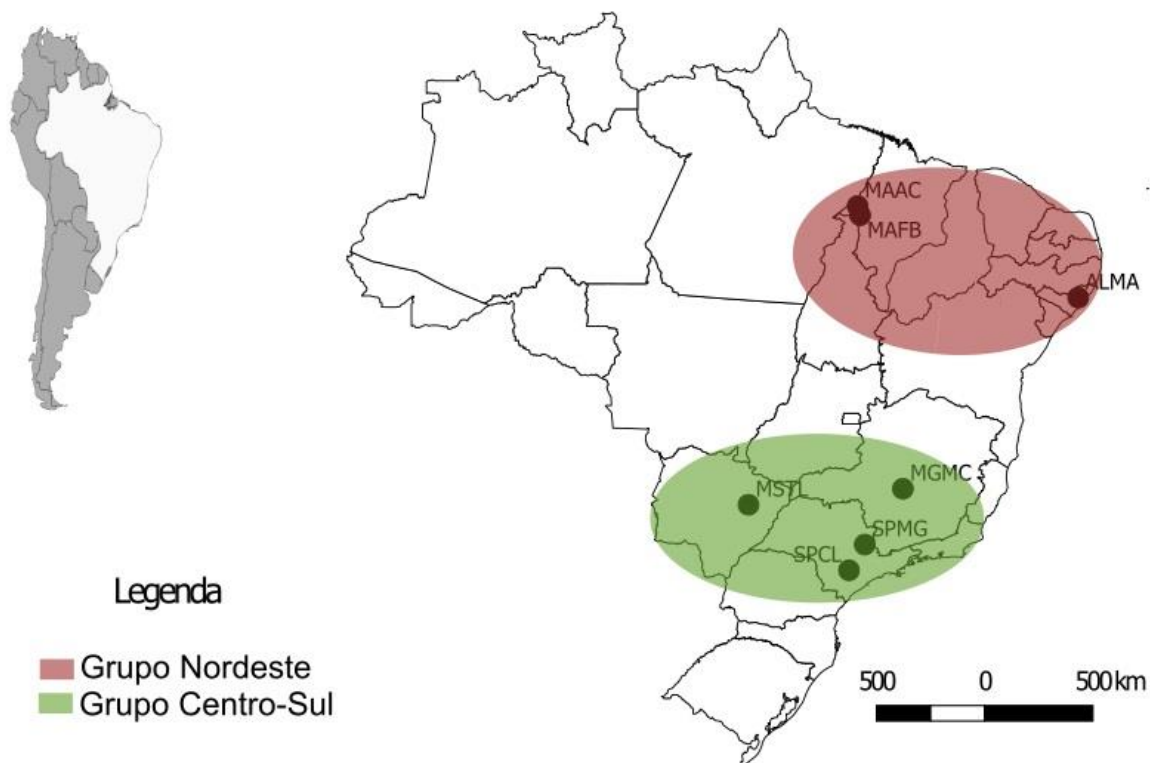
## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1. Áreas de coleta e extração de DNA

Adultos de *T. arnobia* foram coletados em plantios comerciais de eucalipto distribuídos em sete localidades pelo Brasil sob a parceria da empresa Suzano S.A (Tabela e Figura 2.1). Os indivíduos coletados foram trazidos para o Laboratório de Ecologia Molecular de Artrópodes ESALQ-USP onde foram armazenados em freezer (- 20°C) até a extração do DNA genômico.

**Tabela 2.1.** Informações sobre os locais coleta das populações de *Thyrintaina arnobia* no Brasil coletadas entre os anos de 2018 e 2020.

Localidade (Cidade, Estado)	Código de coleta	Latitude (S)	Longitude (O)
São Francisco do Brejão, MA	MAFB	5°13'48.00"	47°20'24.00"
Açailândia, MA	MAAC	4°45'36.02	47°28'12.00"
Maceió, AL	ALMA	9°30'27"	36°01'24"
Três Lagoas, MS	MSTL	20°14'30.75"	53°8'6.50"
Martinho Campos, MG	MGMC	19°24'45.91"	45°7'15.93"
Itapetininga, SP	SPCL	23°38'18.99"	47°55'8.55"
Mogi Guaçu, SP	SPMG	22°18'18.4"	47°06'02.7"



**Figura 2.1.** Pontos de coleta de *T. arnobia* distribuídos em 5 estados brasileiros. Os círculos representam as divisões geográficas dos grupos Nordeste e Centro-Sul.

Para extração do DNA, foi macerado individualmente o tórax de mariposas adultas em nitrogênio líquido e o método padrão de extração do DNA genômico foi seguido, esse método utiliza o tampão CTAB (Brometo de Cetrimônio), proteinase K para digestão das proteínas/enzimas, lavagem com solução de clorofórmio (CIA) e precipitação do DNA total com isopropanol (Adaptado de FERRONATO et al., 2019). O DNA obtido ao final do processo foi ressuscendido em 50 µl de água ultrapura e armazenado em freezer à -20 °C até a futura utilização.

### 2.2.2. Amplificação e sequenciamento do COI

O gene alvo dos estudos foi o gene mitocondrial (mtDNA) citocromo c oxidase subunidade I (COI), então amplificou-se um fragmento desse gene via reação da cadeia da polimerase (PCR) utilizando os seguintes primers para as reações de PCR: LCO1490 (Forward) (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HCO2198 (Reverse) (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') (FOLMER et al., 1994). Em

cada reação de PCR usaram-se os seguintes padrões: 2,0 µl DNTP (2,5 mM) (Sinapse Inc.); 2,0 µl Primer F (5 µM); 2,0 µl Primer R (5 µM); 2,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 2,5 µl tampão (Mg<sup>2+</sup> Free) (Sinapse Inc.); 10,7 µl Água milliQ; 0,3 µl Taq Polimerase (5 U) (Sinapse Inc.); 3 µl de DNA do indivíduo, totalizando um volume de 25 µl por reação. Os ciclos da PCR consistiram em: desnaturação primária à 95 °C por 3 minutos; 35 ciclos de desnaturação por 30 s à 95 °C, anelamento por 30 s à 53 °C e polimerização por 2 min à 72 °C; e finalmente polimerização final à 72 °C por 10 min. Os amplicons de PCR foram visualizados sob luz ultravioleta após eletroforese usando 3 µl de amplicon em 1,5 % v.v<sup>-1</sup> de gel de agarose.

Os fragmentos amplificados foram purificados em laboratório utilizando as enzimas Exonuclease I (EXO I) (20 U/µl) e Fosfatase alcalina termossensível (FastAP) (1 U/µl) (Thermo Scientific™) e sequenciados pelo método de Sanger no Laboratório de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC) localizado na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP). Posteriormente, os cromatogramas foram checados, e as sequências editadas e alinhadas no software Sequencher v.4.0.1. Uma sequência consenso do fragmento do gene COI com tamanho de 596 pb, formado pelo sequenciamento Forward e Reverse, para cada indivíduo foi construída para formar um arquivo FASTA. Em seguida, as sequências editadas usando o algoritmo ClustalW (parâmetros padrão) foram realinhadas dentro de software Mega X (KUMAR et al., 2018) formando o dataset\_1 com 65 sequências de *T. arnobia* originadas do Brasil.

### 2.2.3. Análise dos dados

Utilizando o software DnaSP v6.12.01 (ROZAS et al., 2017), foram calculados os índices de diversidade haplotípica (Hd), número de haplótipos (H) diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e o número médio de diferenças nucleotídicas (k) para as populações de *T. arnobia*. Estabeleceram-se as relações genealógicas entre as sequências de *T. arnobia* construindo uma rede de haplótipos no software PopArt v1.7 (LEIGH & BRYANT, 2015). A rede foi construída pelo método Median Joining considerando os haplótipos encontrados no programa DnaSP v6.12.01 (ROZAS et al., 2017).

Em seguida, foi realizada uma análise de variância molecular (AMOVA) pelo programa Arlequin v3.1 (EXCOFFIER et al., 2005), aplicando 5.000 réplicas para os



parâmetros de bootstrap e 5% de significância. Foram elaboradas análises não-hierárquicas, que consideraram todas as localidades amostradas, e análises populacionais, que como o nome sugere, examinaram a variância entre as populações conforme cada local de coleta.

Os resultados da AMOVA revelaram certa estruturação entre as populações localizadas no Nordeste do Brasil, e as demais. Então, outra análise de variância molecular foi realizada dividindo as populações em dois grupos segundo sua distribuição geográfica. O primeiro grupo foi chamado de grupo Nordeste, e recebeu as populações MAFB, MAAC e ALMA, todas localizadas na região Nordeste do Brasil. E o segundo grupo foi designado como grupo Centro-Sul, e recebeu as populações das Regiões Centro-Oeste (MSTL) e Sudeste (MGMC, SPCL e SPMG) do Brasil. Por conseguinte, calculou-se por meio da AMOVA os seguintes índices de variância molecular:  $\Phi_{CT}$  (variância entre os grupos em relação à variação total);  $\Phi_{ST}$  (variância entre as populações em relação à variação total) e  $\Phi_{SC}$  (variância entre as populações dentro dos grupos) (EXCOFFIER et al., 1992).

Pelo Arlequin, também foram realizadas para os grupos Nordeste e Centro-Sul, e para todas as populações em conjunto, os testes de neutralidade D de Tajima e  $F_s$  de Fu usando simulações de coalescência e 1.000 permutações. A significância considerada para os resultados foi de 95% e p-valor menor do que 0,02. Os testes de neutralidade D de Tajima e  $F_s$  de Fu são baseados em um modelo de sítios infinitos, onde não há recombinação. Distinguindo padrões de mutações casuais neutras de mutações não aleatórias originárias de processos de seleção ou expansão populacional. Valores negativos e significativos de D ou  $F_s$  indicam abundância de polimorfismos de baixa frequência e suportam a hipótese de expansão populacional ou de seleção purificadora, já valores positivos e significativos de D ou  $F_s$  significa que os polimorfismos de baixa frequência são menores que o esperado e apontam para fenômenos de gargalo genético ou de equilíbrio de seleção. Os valores não significativos são consistentes com a hipótese evolução neutra do DNA (FU, 1997; TAJIMA, 1989).

Por fim, para testar a expansão populacional e relacionar os resultados com os testes de neutralidade D de Tajima e  $F_s$  de Fu, conduziu-se uma análise de distribuição mismatch usando um modelo de expansão espacial. A soma dos quadrados dos desvios (SSD), estatísticas do índice de Raggedness (R) e seu p-valor associado também foram calculados usando o Arlequin v.3.1. Um valor SSD não

significativo significa que a hipótese de expansão populacional não pode ser rejeitada, e um R não significativo indica um bom ajuste dos dados ao modelo de expansão espacial. Desta forma, populações em equilíbrio longo e estável devem apresentar um padrão unimodal, enquanto que populações que experimentaram uma expansão recente apresentam geralmente uma distribuição multimodal (ROGERS & HARPENDING, 1992).

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Análises de diversidade e estrutura demográfica de *T. arnobia*

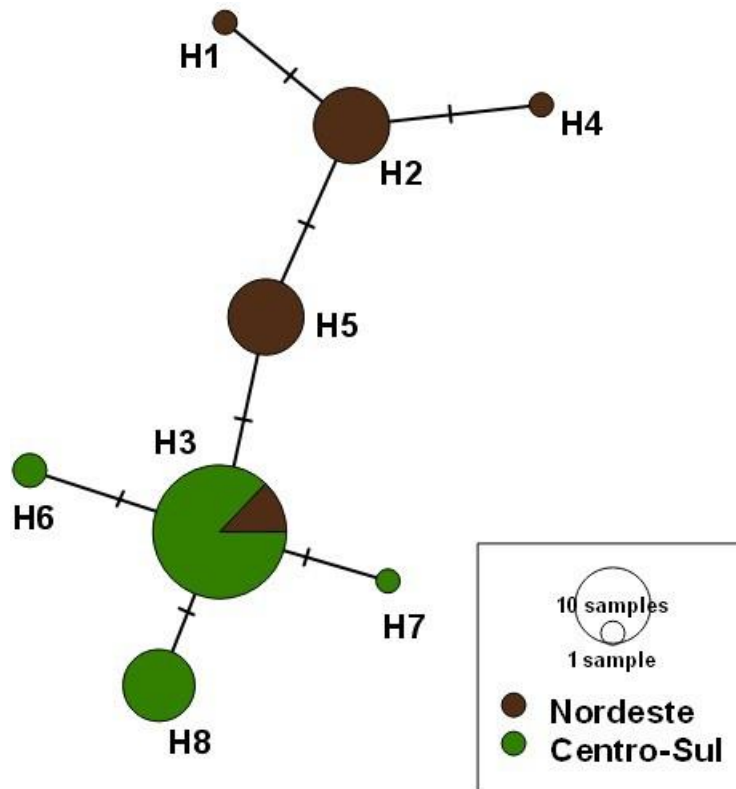
Foram sequenciados com sucesso 65 indivíduos de *T. arnobia* para o gene COI obtendo-se um fragmento de 596 pb. A diversidade haplotípica total foi de  $H_d = 0,715$ , a diversidade nucleotídica de  $\pi = 0,00194$  e o número médio de diferenças nucleotídicas de  $k = 1,15577$ .

**Tabela 2.2.** Índices de diversidade, número de haplótipos e sua distribuição para as populações de *Thyriniteina arnobia* no Brasil, calculados a partir do sequenciamento de um fragmento mtDNA citocromo c oxidase subunidade I (COI)

Localização (Cidade, Estado)	Código	N	Haplótipos (N)	Diversidade haplotípica ( $H_d$ )	Diversidade nucleotídica ( $\pi$ )
São Francisco do Brejão, MA	MAFB	7	H1(1), H2(3), H3(2), H4(1)	0,810	0,00256
Açailândia, MA	MAAC	9	H2(7), H3(2)	0,389	0,00130
Maceió, AL	ALMA	10	H5(10)	0	0
Três Lagoas, MS	MSTL	10	H3(1), H8(9)	0,200	0,00034
Martinho Campos, MG	MGMC	10	H3(10)	0	0
Itapetininga, SP	SPCL	10	H3(8), H6(2)	0,356	0,00060
Mogi Guaçu, SP	SPMG	9	H3(8), H7(1)	0,222	0,00037

A análise da rede de haplótipos gerou um total de 8 haplótipos nos 65 indivíduos de *T. arnobia* amostrados em 7 localidades (Tabela 2.2). O haplótipo mais frequente foi o H3, presente em 49,23% dos indivíduos de *T. arnobia* amostrados, além de estar presente nos dois grupos geográficos da espécie. Os indivíduos do

grupo Nordeste possuem 5 haplótipos, enquanto os do grupo Centro-Sul apresentam 4 haplótipos (**Figura 2.2**). As relações genéticas entre haplótipos apontam uma recente relação filogenética entre os indivíduos reforçada pela baixa diversidade genética e distância de apenas um passo mutacional entre os haplótipos.



**Figura 2.2.** Rede de haplótipos de 65 indivíduos de *T. arnobia* baseada em um fragmento de 556 pb do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI). As cores indicam a distribuição geográfica dos haplótipos considerando a região Nordeste e a região Centro-Sul do Brasil.

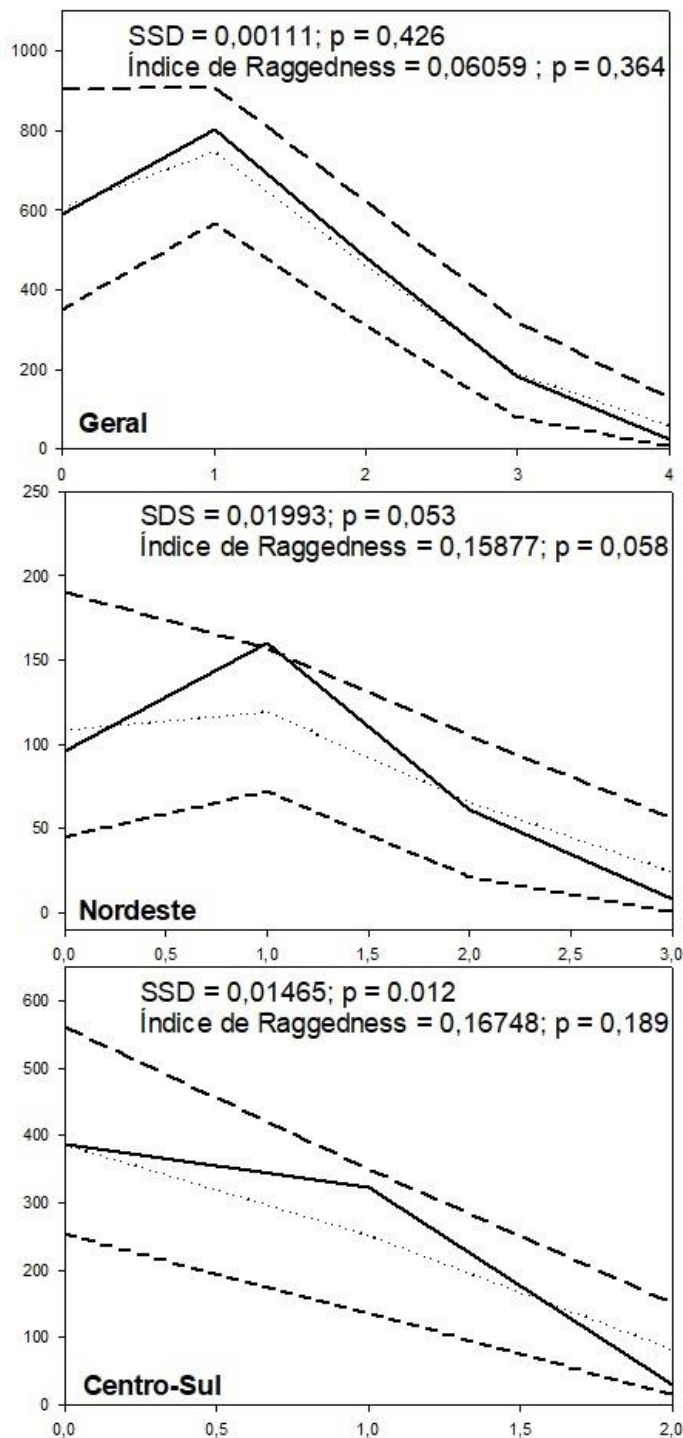
A análise de variância molecular (AMOVA) dos haplótipos encontrados para *T. arnobia* considerando dois níveis hierárquicos revelou uma alta variação entre grupos (70%,  $\Phi_{ST} = 0,70$ ;  $p < 0.001$ ), e consequente baixa variação dentro dos grupos (30%). Quando a AMOVA foi dividida em três níveis hierárquicos (Grupos Nordeste e Centro-Sul), a variação entre grupos diminuiu para 51,87%, e a variação dentro dos grupos diminuiu para 23,17%, demonstrando que a estruturação é gerida pela geografia entre os locais amostrados ( $\Phi_{CT} = 0,52$   $p = 0,03$ ) (**Tabela 2.3**).

**Tabela 2.3.** Análise de variância molecular (AMOVA) para estrutura genética de populações de *Thyriniteina arnobia* utilizando o marcador mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI)

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Componente de variância	Variância (%)	Índice de fixação (p-valor)
<b>Geral</b>					
Entre populações	6	25,913	0,44547 Va	70,0	$\Phi_{ST} = 0,70$ ( $p = 0,000$ )
Dentro de populações	58	11,071	0,19089 Vb	30,0	
Total	64	36,985			
<b>Grupo Nordeste vs. Grupo Centro-Sul</b>					
Entre grupos	1	15,421	0,42739 Va	51,87	$\Phi_{CT} = 0,52$ ( $p = 0,0000$ )
Entre populações dentro de grupos	5	10,493	0,20563 Vb	24,96	$\Phi_{SC} = 0,51$ ( $p = 0,0000$ )
Dentro dos grupos	58	11,071	0,19089 Vc	23,17	$\Phi_{ST} = 0,76$ ( $p = 0,027$ )
Total	64				

Os testes de neutralidade indicam que as populações de *T. arnobia* não estão em expansão ou retração populacional D de Tajima = -0,55;  $p > 0.10$ . Estes resultados demonstram que os polimorfismos encontrados estão de acordo com o modelo de neutralidade proposto por TAJIMA (1989) e que as populações de *T. arnobia* estudadas de maneira geral não se encontram em condições expansão populacional (FU, 1997), o mesmo acontece quando as populações são divididas em grupos, de acordo com os resultados para D de Tajima e Fs de Fu (p-valor) para os grupos Nordeste e Centro-Sul, respectivamente: D = - 0,27 ( $p = 0,433$ ), Fs = - 0,95 ( $p = 0,246$ ); D = - 0,59 ( $p = 0,32$ ), Fs = -0,94 ( $p = 0,212$ ).

Os gráficos de distribuição mismatch para os valores observados e simulados para expansão espacial não foram significativos para os indivíduos de *T. arnobia* quando avaliados como um todo (SSD < 0,002,  $p > 0,42$ ; Raggedness < 0,61,  $p > 0,36$ ). Quando divididos em grupos, os valores SSD foram significativos para a região Centro-Sul indicando uma não expansão/regressão espacial de *T. arnobia* nos locais amostrados, visto que a hipótese nula de padrão unimodal das curvas foi rejeitada, e não significativo ( $p > 0,05$ ) para a região Nordeste, indicando um padrão bimodal de curva (**Figura 2.3**).



**Figura 2.3.** Distribuição espacial de mismatch para os indivíduos de *T. arnobia* como um todo ou quando divididos em grupos de acordo com os locais de coleta. As análises foram geradas com intervalo de confiança de 95% e 1000 replicações de bootstrap. Linhas sólidas representam os valores observados; linhas pontilhadas os valores esperados e linhas interrompidas o intervalo de confiança à 95%. SSD = Soma do desvio do quadrado.

## 2.4. DISCUSSÃO

Este estudo é pioneiro na utilização do mtDNA como uma ferramenta para obtenção de uma perspectiva quanto à genética populacional de *T. arnobia*. Os resultados apontaram baixa diversidade nucleotídica ( $\pi = 0,00194$ ) e mediana diversidade haplotípica ( $Hd = 0,715$ ) global das populações. Dois fatores principais explicam baixos valores de diversidade nucleotídica, rápida expansão geográfica advinda de um efeito fundador (DE JONG et al., 2011; GRANT & BOWEN, 1998) ou eventos recentes de gargalo genético ou seleção natural (KESÄNIEMI et al., 2012; LIU et al., 2019; LOHMAN et al., 2008). Nenhuma das explicações anteriores são totalmente exclusivas, porém a relação haplotípica revelada pela rede de haplótipos de *T. arnobia* não indica expansão populacional por efeito fundador uma vez que a rede de haplótipos não apresenta conformação “star-like” (onde existe um haplótipo central frequente com vários haplótipos menos frequentes partindo desse) e os testes de neutralidade não foram significativos. Assim, se sugere que as populações de *T. arnobia* passaram por efeitos de gargalo genético ou seleção recente (AVISE, 2000; BUBAC & SPELLMAN, 2016; LAVAGNINI et al., 2015; MELOSIK et al., 2019).

Avaliando as relações genealógicas e a distribuição geográfica dos haplótipos de *T. arnobia*, relata-se uma forte estruturação genética entre as populações considerando as regiões geográficas Nordeste e Centro-Sul. Essa estruturação foi confirmada pelos índices estimados pela AMOVA, que demonstraram que a maior parte da variância encontrada entre as populações está separada entre grupos (Nordeste e Centro-Sudeste). A AMOVA considera as distribuições das frequências entre os haplótipos utilizando estatísticas F e medindo a interdependência entre a variabilidade genética que pode sofrer alteração por fenômenos evolutivos, como migração ou taxa mutacional (EXCOFFIER & HECKEL, 2006). A rede de haplótipos, por sua vez, considera as relações genealógicas entre os haplótipos (LEIGH & BRYANT, 2015).

Essa forte estruturação genética entre as regiões brasileiras nos permite fazer três conclusões sobre as populações naturais de *T. arnobia*: o fluxo gênico entre as populações de *T. arnobia* de diferentes regiões brasileiras não é forte o bastante para homogeneizar, entre as populações, os alelos fixados pela deriva genética ou a pela seleção natural promovida pelas condições bióticas e abióticas de cada região; as populações de *T. arnobia* que colonizam os cultivos de eucalipto já estavam presentes

em hospedeiros nativos nas diferentes regiões brasileiras e os cultivos de eucalipto influenciaram pouco na dinâmica de fluxo gênico entre as populações brasileiras de *T. arnobia* entre essas regiões; e que esses resultados reforçam a existência de apenas uma subespécie no Brasil (*T. arnobia arnobia*), como citada por RINDGE (1961).

Os testes de neutralidade  $F_s$  de  $F_u$  e  $D$  de Tajima testaram aspectos demográficos para as populações de *T. arnobia*, e são testes geralmente baseados na distribuição de diferenças de pares entre sequências dentro de populações. O teste  $D$  de Tajima é fundamentado na distribuição de frequência de alelo de sítios segregantes. Valores positivos indicam uma predisposição para alelos de frequência intermediária, ao passo que valores negativos indicam uma predisposição para alelos raros, sendo o último associado às expansões populacionais (demográficas) recentes (TAJIMA, 1989). Já o teste  $F_s$  de  $F_u$  é baseado na distribuição de haplótipos ou alelos, onde valores negativos também assinalam eventos de expansão populacional recente (FU, 1997). Os resultados demonstraram valores negativos, mas não significativos ( $p$ -valor  $> 0,02$ ) para todos os testes, refutando a hipótese de expansão demográfica para *T. arnobia*, como já anteriormente apontado pela rede de haplótipos. Esse padrão de resposta não é comum em pragas agrícolas, pois os cultivos se demonstram uma grande fonte de recurso para aumento do número efetivo de indivíduos nas populações de espécies nativas e conseqüente o surgimento de novos alelos que são fixados nas populações (ARIAS et al., 2019; LEITE et al., 2017; SOARES et al., 2018). Desta forma, sugere-se que apesar de *T. arnobia* ser uma praga importante dos cultivos de eucalipto, esse não contribuiu para uma expansão demográfica das populações naturais de *T. arnobia*.

Ao contrário dos resultados de expansão demográfica, o teste de *mismatch distribution* acusou expansão espacial para *T. arnobia*, analisada como um todo, e para o grupo Nordeste. O grupo Centro-Sul parece não estar sob expansão espacial conforme a análise de mismatch. Valores não significativos de soma dos quadrados dos desvios (SSD) e do índice de Raggedness (R) indicam um modelo de expansão espacial (ROGERS & HARPENDING, 1992). Buscando uma explicação plausível para os resultados contrastantes de expansão demográfica x expansão espacial, pode-se pensar que, mesmo que as populações de *T. arnobia* estejam demograficamente estáveis, existe uma expansão espacial para as regiões do Nordeste do Brasil, que é a área que atualmente demonstra um maior crescimento dos plantios de eucalipto.

Em 2005 por exemplo, os únicos relatos existentes de florestas de eucalipto no Nordeste são dos estados da Bahia (527.386 ha) e do Maranhão (60.745 ha), enquanto todos os estados das Regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul já possuíam florestas plantadas de eucalipto, com a exceção do estado do Rio de Janeiro (ABRAF, 2006). Em 2019, o estado do Alagoas já aparece nas estatísticas de áreas plantadas (18.528 ha), juntamente com o Piauí (25.281 ha), além dos estados já mencionados com áreas plantadas de eucalipto: Bahia (com aumento da área de aproximadamente 12% em relação ao ano de 2005) e Maranhão (com aumento da área de 74,5% em relação ao ano de 2005) (IBÁ, 2020).

Um outro fator que pode explicar os resultados que demonstram expansão espacial das populações de *T. arnobia* presentes na Região Nordeste, é a composição botânica nativa de plantas hospedeiras da lagarta-parda-do-eucalipto que mantém a população natural de indivíduos. Dentre os biomas brasileiros, a Mata Atlântica se sobressai como o bioma com a maior riqueza de espécies da família Myrtaceae (BARROSO & PEIXOTO, 1995; MORAIS et al., 2014; PEIXOTO & GENTRY, 1990). A relação de hospedeiros nativos de *T. arnobia*, ocorrência nos estados brasileiros (de acordo com SiBBR, 2020) e porcentagem de espécies hospedeiras por estado está apresentada na tabela A.1. na seção de Apêndices. Comparando as regiões Nordeste e Centro-Sul do país, a média de ocorrência dos hospedeiros nativos de *T. arnobia* é de 31,78% para os estados do Nordeste, e 54,36% para os estados das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Portanto, teoricamente, os plantios de eucalipto estejam favorecendo a expansão espacial dessa espécie na Região Nordeste, pela menor riqueza de hospedeiros nativos em comparação à Região Centro-Sul.

Uma análise mais robusta incluindo um maior número de pontos amostrais e adição de outros marcadores moleculares neutros e, principalmente, adaptativos podem nos proporcionar uma perspectiva mais completa sobre os padrões de diversidade, demográficos e como as forças evolutivas (deriva genética e seleção natural) estão moldando as populações de *T. arnobia* no Brasil. Informações imprescindíveis para o desenvolvimento de processos e tecnologias para o manejo sustentável dessa praga na cultura do eucalipto no Brasil.



## REFERÊNCIAS

- ABRAF (2006). ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS Anuário estatístico da ABRAF 2006: ano base 2005. *Technical report*, Brasília.
- ALFENAS, Acelino Couto; ZAUZA, Edival Ângelo Valverde; MAFIA, Reginaldo Gonçalves; ASSIS, Teotônio Francisco De. (2009). *Clonagem e doenças do eucalipto*. 2. ed. atual. Viçosa: Viçosa UFV, 500p.
- ANJOS, N. (1987). A lagarta-parda, *Thyriniteina arnobia* Stoll, 1782 (Lepidoptera: Geometridae) desfolhadora de eucaliptos. In EPAMIG, editor, *EPAMIG*, volume Boletim Técnico, page 56. Belo Horizonte.
- ARIAS, O., CORDEIRO, E., CORRÊA, A. S., DOMINGUES, F. A., GUIDOLIN, A. S., e OMOTO, C. (2019). Population genetic structure and demographic history of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): implications for insect resistance management programs. *Pest management science*, 75(11), 2948-2957.
- AVISE, J. C. (2000). Phylogeography — The History and Formation of Species. *Heredity*, 85(2):201.
- AVISE, J. C., ARNOLD, J., BALL, R. M., BERMINGHAM, E., LAMB, T., NEIGEL, J. E., REEB, C. A., e SAUNDERS, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18(1):489–522.
- BARROSO, G. M. e PEIXOTO, A. L. (1995). Myrtaceae na Reserva Florestal de Linhares, ES, Brasil – gêneros *Calypttranthes* e *Marlierea*. *Boletim do Museu de Biologia Melo Leitão*, 3:3–38.
- BERTI FILHO, E. (1974). Biologia de *Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera, Geometridae) e observações sobre a ocorrência de inimigos naturais. PhD thesis, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BUBAC, C. M. e SPELLMAN, G. M. (2016). How connectivity shapes genetic structure during range expansion: Insights from the Virginia’s Warbler. *The Auk*, 133(2):213–230.

- CORDEIRO, E. M. G., PANTOJA-GOMEZ, L. M., PAIVA, J. B., NASCIMENTO, A.R. B., OMOTO, C., MICHEL, A. P., e CORRÊA, A. S. (2020). Hybridization and introgression between *Helicoverpa armigera* and *H. zea*: an adaptational bridge. *BMC Evolutionary Biology*, 20(1):61.
- CORRÊA, A. S., CORDEIRO, E. M., & OMOTO, C. (2019). Agricultural insect hybridization and implications for pest management. *Pest management science*, 75(11), 2857-2864.
- COX, G. W. (2004). *Alien species and evolution the evolutionary ecology of exotic plants, animals, microbes, and interacting native species*. Island Press, Washington.
- DE JONG, M. A., WAHLBERG, N., VAN EIJK, M., BRAKEFIELD, P. M., e ZWAAN, B. J. (2011). Mitochondrial DNA Signature for Range-Wide Populations of *Bicyclus anynana* Suggests a Rapid Expansion from Recent Refugia. *PLoS ONE*, 6(6):e21385.
- EXCOFFIER, L. e HECKEL, G. (2006). Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nature Reviews Genetics*, 7(10):745–758.
- EXCOFFIER, L., LAVAL, G., e SCHNEIDER, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1:47–50.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P. E., e QUATTRO, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2):479–491.
- FERRONATO, P., WOCH, A. L., SOARES, P. L., BERNARDI, D., BOTTON, M., OLIVEIRA, E. E., e CORRÊA, A. S. (2019). A phylogeographic approach to the *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) invasion in Brazil. *Journal of Economic Entomology*, 112(1):425–433.
- FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W., LUTZ, R., e VRIJENHOEK, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3(5):294–9.
- FRESIA, P., AZEREDO-ESPIN, A. M. L., e LYRA, M. L. (2013). The Phylogeographic History of the New World Screwworm Fly, Inferred by Approximate Bayesian Computation Analysis. *PLoS ONE*, 8(10):e76168.
- FU, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2):915–925.

- GOUDARZI, F., HEMAMI, M.-R., RANCILHAC, L., MALEKIAN, M., FAKHERAN, S., ELMER, K. R., e STEINFARTZ, S. (2019). Geographic separation and genetic differentiation of populations are not coupled with niche differentiation in threatened Kaiser's spotted newt (*Neurergus kaiseri*). *Scientific Reports*, 9(1):6239.
- GRANT, W. S. e BOWEN, B. W. (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89(5):415–426.
- HOLTZ, A. M., de OLIVEIRA, H. G., PALLINI, A., VENZON, M., ZANUNCIO, J. C., OLIVEIRA, C. L., MARINHO, J. S., e ROSADO, M. d. C. (2003). Desempenho de *Thyrintina arnobia* Stoll (Lepidoptera: Geometridae) em eucalipto e goiaba: o hospedeiro nativo não é um bom hospedeiro? *Neotropical Entomology*, 32(3):427–431.
- IBÁ (2014). Relatório 2014 - Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ). Technical report.
- IBÁ (2020). Relatório anual 2020 - Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ). Technical report.
- KESÄNIEMI, J. E., RAWSON, P. D., LINDSAY, S. M., e KNOTT, K. E. (2012). Phylogenetic analysis of cryptic speciation in the polychaete *Pygospio elegans*. *Ecology and Evolution*, 2(5):994–1007.
- KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C., e TAMURA, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6):1547–1549.
- LAVAGNINI, T. C., MORALES, A. C., e FREITAS, S. (2015). Population genetics of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) and implications for biological control. *Brazilian Journal of Biology*, 75(4):878–885.
- LEIGH, J. W. e BRYANT, D. (2015). Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9):1110–1116.
- LEITE, N. A., CORRÊA, A. S., MICHEL, A. P., ALVES-PEREIRA, A., PAVINATO, V., ZUCCHI, M. I., e OMOTO, C. (2017). Pan-American Similarities in Genetic Structures of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) With Implications for Hybridization. *Environmental Entomology*, 46(4):1024–1034.
- LIU, Y., DIETRICH, C. H., e WEI, C. (2019). Genetic divergence, population differentiation and phylogeography of the cicada *Subpsaltria yangi* based on molecular and acoustic data: an example of the early stage of speciation? *BMC Evolutionary Biology*, 19(1):5.

- LOHMAN, D. J., PEGGIE, D., PIERCE, N. E., e MEIER, R. (2008). Phylogeography and genetic diversity of a widespread Old World butterfly, *Lampides boeticus* (Lepidoptera: Lycaenidae). *BMC Evolutionary Biology*, 8(1):301.
- MASIER, S. e BONTE, D. (2020). Spatial connectedness imposes local - and metapopulation-level selection on life history through feedbacks on demography. *Ecology Letters*, 23(2):242–253.
- MELOSIK, I., WALCZAK, U., STASZAK, J., WINNICKA, K., e BARANIAK, E. (2019). Is there a host-associated molecular and morphological differentiation between sympatrically occurring individuals of the invasive leaf miner *Cameraria ohridella*? *Arthropod-Plant Interactions*, 13(6):853–864.
- MÖLLER, C., WEBER, G., e DREYFUSS, M. (1996). Intraspecific diversity in the fungal species: Implications for microbial screening programs. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 17(5-6):359–372.
- MORAIS, L. M. F., CONCEIÇÃO, G. M., e NASCIMENTO, J. d. M. (2014). Família Myrtaceae: Análise morfológica e distribuição geográfica de uma coleção botânica. *Agarian Academy*, 1(1):317–346
- ODA, S. e BERTI FILHO, E. (1978). Incremento anual volumétrico de *Eucalyptys saligna* Sm. em áreas com diferentes níveis de infestação de lagartas de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1872) (Lepidoptera: Geometridae). *IPEF*, 17:27–31.
- OLIVEIRA, H. N., ZANUNCIO, J. C., PEDRUZZI, E. P., e ESPINDULA, M. C. (2005). Rearing of *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) on guava and eucalyptus in laboratory. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(5):801–806.
- PEIXOTO, A. L. e GENTRY, A. (1990). Diversidade e composição florística da mata de tabuleiro na Reserva Florestal de Linhares (Espírito Santo, Brasil.). *Revista Brasileira de Botânica*, 13(1):19–25.
- PERETOLCHINA, T., PAVAN, M. G., CORRÊA-ANTÔNIO, J., GURGEL-GONÇALVES, R., LIMA, M. M., e MONTEIRO, F. A. (2018). Phylogeography and demographic history of the Chagas disease vector *Rhodnius nasutus* (Hemiptera: Reduviidae) in the Brazilian Caatinga biome. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(9):e0006731.
- QUEIROZ, L. R. d. S. e BARRICHELO, L. E. G. (2007). O eucalipto, um século no Brasil = The eucalypt - a century in Brazil. Antonio Nellini Editora & Cultura, São Paulo, 1 edition.

- RINDGE, Frederick H. (1961) A revision of the Nacophorini (Lepidoptera, Geometridae). *Bulletin of Entomological Research*, v. 123, n. 2, p. 91–153.
- ROGERS, A. R. e HARPENDING, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9(3):552– 569.
- ROZAS, J., FERRER-MATA, A., SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C., GUIRAO-RICO, S., LIBRADO, P., RAMOS-ONSINS, S. E., e SÁNCHEZ-GRACIA, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12):3299–3302.
- SILVA, C. S., CORDEIRO, E. M., PAIVA, J. B., DOURADO, P. M., CARVALHO, R. A., HEAD, G., MARTINELLI, S., e CORRÊA, A. S. (2020). Population expansion and genomic adaptation to agricultural environments of the soybean looper, *Chrysodeixis includens*. *Evolutionary Applications*, page eva.12966.
- SiBBR Sistema da Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBR). Disponível em: <<https://sibbr.gov.br/>> Acesso em 15 de jan. de 2020.
- SOARES, P. L., CORDEIRO, E. M. G., SANTOS, F. N. S., OMOTO, C., e CORRÊA, A. S. (2018). The reunion of two lineages of the Neotropical brown stink bug on soybean lands in the heart of Brazil. *Scientific Reports*, 8(1):2496.
- STRÖHER, P. R., MEYER, A. L. S., ZARZA, E., TSAI, W. L. E., McCORMACK, J. E., e PIE, M. R. (2019). Phylogeography of ants from the Brazilian Atlantic Forest. *Organisms Diversity & Evolution*, 19(3):435–445.
- TAJIMA, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3):585–595.
- VAN NOUHUYS, S. (2016). Metapopulation Ecology. In eLS, pages 1–9. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- VARGAS-ORTIZ, M., BOBADILLA, D., HUANCA-MAMANI, W., e VARGAS, H. A. (2018). Genetic divergence of isolated populations of the native micromoth *Bucculatrix mirnae* (Lepidoptera: Bucculatricidae) in the arid environments of Northern Chile. *Mitochondrial DNA Part A*, 29(8):1139–1147.
- WARDHANA, A., HALL, M., MAHAMDALLIE, S., MUHARSINI, S., CAMERON, M., e READY, P. (2012). Phylogenetics of the Old World screwworm fly and its significance for planning control and monitoring invasions in Asia. *International Journal for Parasitology*, 42(8):729–738.

ZANUNCIO, J. C., PEREIRA, J. M. M., ZANUNCIO, T. V., e NASCIMENTO, E. C. (1991). Aspectos biológicos de *Blera varana* (Lepidoptera: Notodontidae), desfolhador de eucalipto. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 20(1):35–43.



### 3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E DEMOGRAFIA DE *Gonipterus platensis* E *G. pulverulentus* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) NO BRASIL

#### RESUMO

Os curculionídeos-praga conhecidos como gorgulho-do-eucalipto fazem parte de um agrupamento de oito espécies crípticas, nativas da Austrália, chamado de “complexo *Gonipterus scutellatus*”. A identificação das espécies do complexo *G. scutellatus* permaneceu um tanto obscura durante vários anos, e hoje no Brasil, estão presentes as espécies *G. platensis* e *G. pulverulentus*. Dentro do complexo *G. scutellatus*, informações sobre a diversidade genética dessas espécies podem contribuir para melhorar a delimitação geográfica de distribuição das espécies dentro complexo, resolver problemas de identificação das espécies crípticas e auxiliar em estratégias de manejo. Dessa forma, os objetivos foram: (i) identificar molecularmente as espécies de *Gonipterus* presentes no Brasil e inferir sua distribuição geográfica no país; (ii) construir marcadores moleculares espécies-específicos para as espécies de *Gonipterus* presentes no Brasil; e (iii) estimar a diversidade genética, os parâmetros demográficos e de estrutura populacional de *G. platensis* no Brasil. Utilizaram-se indivíduos de *Gonipterus* provenientes de 7 locais do Brasil. Posteriormente, sequenciou-se um fragmento do gene COI que serviu como base para as análises filogenéticas, de identificação molecular e de demografia. Os resultados confirmaram a presença das espécies *G. platensis* e *G. pulverulentus* no Brasil. Foi possível identificar molecularmente as espécies crípticas *G. platensis* e *G. pulverulentus* mediante utilização de primers específicos que revelou que a distribuição de *G. pulverulentus* é restrita ao Sul do país, enquanto *G. platensis* ocorre na região Sul, em sobreposição com *G. pulverulentus*, e nas Sudeste e Nordeste do Brasil. Os resultados de estruturação populacional de *G. platensis* indicaram que provavelmente a introdução dessa espécie no Brasil é oriunda de um único evento e que dentro do país, as populações de *G. platensis* apresentam baixa diversidade genética. No entanto, essa diversidade está estruturada entre as regiões ao Sul e ao Nordeste do país. As populações brasileiras, apesar de expansão espacial, não parecem estar em expansão demográfica, se mantendo estáveis dentro do Brasil. As medidas de boas práticas silviculturais devem ser reforçadas para impedir reintroduções, evitar introduções de outras espécies de *Gonipterus* spp. ainda ausentes no Brasil e conter o avanço natural do gorgulho-do-eucalipto para outros estados brasileiros.

**Palavras-chave:** gorgulho-do-eucalipto; identificação molecular; diversidade populacional; demografia.



## MOLECULAR IDENTIFICATION AND DEMOGRAPHY OF *Gonipterus platensis* AND *G. pulverulentus* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) IN BRAZIL

### ABSTRACT

The curculionids-pests known as eucalyptus snout beetles are part of a group of eight sibling species, native to Australia, called the "*Gonipterus scutellatus* complex." The identification of the *G. scutellatus* species complex remained obscure for several years, and today in Brazil, the species *G. platensis* and *G. pulverulentus* are described as presents. Within the *G. scutellatus* complex, information about these species' genetic diversity can contribute to improving the geographic delimitation of species distribution within the complex, solve problems of identification of sibling species, and assist in management strategies. Thus, the objectives were: (i) to identify the species of *Gonipterus* present in Brazil molecularly and to infer their geographic distribution in the country; (ii) build species-specific molecular markers for *Gonipterus* species present in Brazil; and (iii) estimate the genetic diversity, demographic and population structure parameters of *G. platensis* in Brazil. We used *Gonipterus* individuals from 7 locations in Brazil. Subsequently, a fragment of the COI gene was sequenced, which served as the basis for the phylogenetic molecular identification, and demography analyzes. The results confirmed the presence of the species *G. platensis* and *G. pulverulentus* in Brazil. It was possible to molecularly identify the sibling species *G. platensis* and *G. pulverulentus* through the specific primers that revealed that *G. pulverulentus* is restricted to the South of the country. In contrast, *G. platensis* occurs in the South, overlapping with *G. pulverulentus* and Brazil's Southeast and Northeast. The results of the population structure of *G. platensis* revealed that the introduction of this species in Brazil is probably due to a single event and that populations of *G. platensis* have low genetic diversity within the country. However, this diversity is structured between the regions to the south and northeast of the country. Despite the spatial expansion, Brazilian populations do not appear to be undergoing demographic expansion in the Brazilian territory, remaining stable. The measures of good silvicultural practices must be reinforced to prevent reintroductions and avoid introductions of other *Gonipterus* spp. still absent in Brazil, and to contain the natural advance of eucalyptus weevils to other Brazilian states.

**Keywords:** eucalyptus snout beetle; molecular identification; population diversity; demography.

### 3.1. INTRODUÇÃO

Os curculionídeos conhecidos como gorgulho-do-eucalipto fazem parte de um agrupamento de oito espécies crípticas, nativas da Austrália, chamado de “complexo *Gonipterus scutellatus*”. Atualmente, três espécies desse complexo estão introduzidas ao redor do mundo: *Gonipterus platensis* (Marelli, 1926), *G. pulverulentus* Lea, 1897 e uma espécie ainda não descrita, denominada por MAPONDERA et al. (2012) como *Gonipterus* sp. n. 2 (JEGER et al., 2018; MAPONDERA et al., 2012; SCHRÖDER et al., 2020). As espécies de *Gonipterus* spp. diminuem a produtividade do eucalipto por causarem a desfolha das copas das árvores, deixando-as com aspecto típico conhecido como vassoura-de-bruxa causado pela quebra das dormências de gemas presentes nos ramos e cascas do eucalipto (GONÇALVES et al., 2019; LANFRANCO & DUNGEY, 2001; LOCH & MATSUKI, 2010; TOOKE, 1955). E por isso, aparecem em listas de pragas quarentenárias de vários países (EPPO, 2005).

A identificação das espécies do complexo *G. scutellatus* permaneceu um tanto obscura durante vários anos. Citando o Brasil como exemplo, até o ano de 2012, considerava-se que as duas espécies presentes no país eram *G. scutellatus* (Gyllenhal, 1833) e *G. gibberus* (Boisduval, 1835), quando na verdade, essas espécies não são encontradas fora de seu local de origem e mesmo em suas regiões de endemismo, são pouco detectadas durante as coletas (MAPONDERA et al., 2012). Ademais, *G. gibberus*, é uma espécie à parte, e não pertence ao complexo *G. scutellatus*. Essas descobertas foram alcançadas, após análises morfológicas da genitália masculina dos besouros juntamente com a utilização de ferramentas moleculares, sendo preciso hoje, em razão da presença de espécies crípticas, a utilização de uma dessas ferramentas para uma identificação precisa ao nível de espécie (GARNAS et al., 2011; JEGER et al., 2018; MAPONDERA et al., 2012).

A relação entre insetos-pragas, agricultura e globalização tem favorecido a invasão de espécies exóticas para fora de sua área nativa (ANDERSON et al., 2016; SILLERO et al., 2020; WESTPHAL et al., 2008). Esses eventos de introdução representam riscos graves para a diversidade nativa, para o homem e para a agricultura, afetando negativamente a economia (LEE, 2002; LUQUE et al., 2014; PAINI et al., 2016; PIMENTEL et al., 2000). As estimativas de perdas causadas por insetos invasores giram em torno de US\$ 70 bilhões por ano, sendo estimado US\$ 10

bilhões anuais para a indústria florestal e US\$ 6,9 bilhões anuais para os custos relacionados à saúde humana (BRADSHAW et al., 2016).

No Brasil os primeiros relatos da presença de *Gonipterus* datam da década de 1950, quando foi identificada a espécie *G. pulverulentus*, descrita anteriormente como *G. gibberus* (BARBIELINI, 1955 citado por FREITAS, 1991). Anos depois, FREITAS (1979) informa a presença de *G. platensis* (identificada como *G. scutellatus*) no estado do Paraná. E desde então, essas duas espécies permanecem no território brasileiro causando danos aos plantios comerciais de eucalipto. *G. platensis* é a espécie com maior distribuição no território brasileiro, já reportada nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Espírito Santo, e *G. pulverulentus* nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (EPPO, 2005; JEGER et al., 2018; SCHRÖDER et al., 2020; WILCKEN et al., 2008).

A difusão da aplicação de ferramentas moleculares na Taxonomia, auxilia na resolução de problemas como a identificação de espécies crípticas proporcionando cada vez mais, maior robustez na determinação de posições sistemáticas e avaliação da biodiversidade nos sistemas agrícolas (SCHLICK-STEINER et al., 2010; CORREA et al., 2013). Já quando as metodologias moleculares são aplicadas no campo da Ecologia, estudos sobre fluxo gênico, estrutura populacional, variação intra e interespecífica, eventos de retração e expansão populacional etc., podem sobrevir (CHOUPINA & MARTINS, 2015). Esse ramo, da ciência denominado Ecologia Molecular permite elucidar, por exemplo, os processos evolutivos de espécies que chegam a um novo ambiente (CAO et al., 2017; WEI et al., 2015). Recentemente, FERRONATO et al. (2019) traçaram as possíveis rotas de introdução de *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae), uma praga de frutos, no Brasil, e SANTOS et al. (2021) descobriram a presença de outra espécie do parasitoide do gênero *Psyllaephagus* da praga florestal *Glycaspis brimblecombei* (Moore, 1964) (Hemiptera: Aphalaridae), no país.

Dentro do Reino Animal, os principais marcadores moleculares utilizados em estudos de populações e de filogenia são fundamentados em sequências de DNA mitocondrial (mtDNA) (AVISE, 2009), visto que esses marcadores possuem particularidades próprias, como, método de herança uniparental (materno), arranjo molecular simples, baixo índice de recombinação, alta taxa amplificação, além de possuírem vários primers já disponíveis na literatura (AVISE et al., 1987; FREELAND, 2011; SIMON et al., 2006). Dentre os genes mais utilizados nos estudos

populacionais, podemos citar os genes Citocromo c Oxidase Subunidade I (COI), o Citocromo B (CytB), o gene ribossomal 16S entre outros (SHOUCHE & PATOLE, 2000; SIMON et al., 1994; SOARES et al., 2018; MANDAL et al., 2014). Além dos estudos populacionais a primeira porção do gene COI também é utilizado como ferramenta de identificação de espécies em animais, denominado DNA barcode (HEBERT et al., 2003).

Ao passar dos anos, a compreensão sobre a diversidade genética das espécies vem recebendo maior relevância nas tomadas de decisão dentro do manejo integrado de pragas (MIP) (KARLSSON GREEN et al., 2020). Essas informações genéticas podem ser mensuradas e nos ajudar a elucidar os processos evolutivos que ocorrem com as espécies. Dentro do complexo *G. scutellatus*, essas informações irão contribuir para melhorar a delimitação de distribuição das espécies dentro complexo, resolver problemas de taxonomia (por identificar molecularmente as espécies crípticas) e auxiliar em estratégias de manejo, como por exemplo, características genéticas possibilitam escolher quais agentes de controle biológico são melhores para uma espécie, linhagem ou biótipo (SCHRÖDER et al., 2020). Dessa forma, os objetivos foram: (i) identificar molecularmente as espécies de *Gonipterus* presentes no Brasil; (ii) construir marcadores moleculares espécies-específicos para rápida e precisa identificação das espécies de *Gonipterus* presentes no Brasil e inferir a distribuição geográfica no país; e (iii) utilizando uma abordagem filogeográfica, estimar a diversidade genética, os parâmetros demográficos e de estrutura populacional de *G. platensis* no Brasil.

## 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1. Coleta de insetos e extração de DNA

A amostragem dos indivíduos de *Gonipterus* spp. foi realizada em parceria com as empresas Suzano S.A., Klabin S.A. e pelo Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF) em plantios comerciais de eucalipto. Foram coletados em torno de 15 indivíduos adultos em sete localidades diferentes (**Tabela 3.1**) que foram acondicionados a temperatura de -20 °C até a extração do DNA.

**Tabela 3.1.** Localização das populações coletadas de *Gonipterus* spp. em eucalipto no território brasileiro, ente os anos de 2018 e 2020.

Localidade (Cidade, Estado)	Código de coleta	Latitude (S)	Longitude (O)
Não informada, RS	HFNV	-	-
Arroio dos Ratos, RS	RSAR	30°10'49.13"	51°45'3.39"
Telêmaco Borba, PR	PRPN	24°19'25.39	50°37'15.05"
Itirapina, SP	SPTI	22°12'36.00"	47°57'36.00"
Itararé, SP	SPIT	24°10'48.00"	49°13'12.00"
São Mateus, ES	ESSM	18°45'36.00"	39°57'0.00"
Mucuri, BA	BAMU	18°02'53.9"	39°59'35.5"

Para extração do DNA, foram macerados individualmente a cabeça e pronoto dos besouros adultos em nitrogênio líquido e seguiu-se o método padrão de extração do DNA genômico que utiliza o tampão CTAB (Brometo de Cetrimônio) (Adaptado de FERRONATO et al., 2019). Adicionou-se aos tubos contendo os indivíduos macerados 500 µl do tampão CTAB 2% (100 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M de NaCl; 0,02 M de EDTA, pH 8,0; CTAB 2%), 2 µl de β-mercaptoetanol (0,2%) e 10 µl de proteinase K (25 mg/ml). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em um agitador tipo vórtex sob velocidade máxima e incubadas em banho maria à 65 °C por 3 horas. Concluído o tempo de incubação, foram adicionados em cada tubo 3 µl de RNase A (10 mg/ml) (Sigma®). Os tubos foram agitados novamente no vórtex e levados mais uma vez para o banho maria, onde ficaram por mais 2 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 14000 rpm e o sobrenadante formado foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado 500 µl de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 v/v). Logo após, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos à 14000 rpm e mais uma vez o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Os processos de adição de CIA, centrifugação, retirada do sobrenadante e passagem para um novo tubo foram repetidos, e então, adicionou-se 500 µl de isopropanol a cada amostra. O isopropanol possui a função de precipitação do DNA, então cada amostra foi mantida em freezer à -20°C por uma noite para total precipitação do DNA genômico. No dia seguinte, as amostras passaram por um processo de centrifugação por 30 minutos à 14000 rpm e 4 °C formando os pellets de DNA. Em seguida, o sobrenadante gerado foi descartado e os pellets foram lavados com 500 µl de etanol 70% e imediatamente com etanol 95%. Depois das lavagens, os pellets secaram por completo dentro da capela de exaustão em temperatura ambiente

e por fim, os foram ressuspensos em 45 µl de água ultrapura. Todo DNA extraído foi estocado à -20°C.

### 3.2.2. Amplificação e sequenciamento do COI

Amplificou-se um fragmento do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI) via reação da cadeia da polimerase (PCR) a partir do DNA total extraído de cada indivíduo em cada localidade amostrada. Foram utilizados para as reações de PCR os seguintes primers descritos por SIMON et al. (2006): C1J2183 (Forward) (5'-CAACATTTATTTTGATTTTTTGG-3') e TL2N3014 (Reverse) (5'-TCCATTGCACTAATCTGCCATATTA-3').

Em cada reação de PCR usou-se os seguintes padrões: 2,0 µl DNTP (2,5 mM) (Sinapse Inc.); 2,0 µl Primer F (5 µM); 2,0 µl Primer R (5 µM); 4,0 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 2,5 µl tampão (Mg<sup>2+</sup> Free) (Sinapse Inc.); 8,2 µl Água milliQ; 0,3 µl Taq Polimerase (5 U) (Sinapse Inc.); 4 µl de DNA do indivíduo, totalizando um volume de 25 µl por reação. Os ciclos da PCR consistiram em: desnaturação primária à 95 °C por 3 minutos; 35 ciclos de desnaturação por 30 s à 95 °C, anelamento por 30 s à 50 °C e polimerização por 2 min à 72 °C; e finalmente polimerização final à 72 °C por 10 min. Os amplicons de PCR foram visualizados sob luz ultravioleta após eletroforese usando 3 µl de amplicon em 1,5 % v.v<sup>-1</sup> de gel de agarose.

Os fragmentos amplificados foram purificados em laboratório utilizando as enzimas Exonuclease I (EXO1) (20 U/µl) e Fosfatase alcalina termossensível (FastAP) (1 U/µl) (Thermo Scientific™) e sequenciados de maneira bidirecional pelo método de Sanger no Laboratório de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC) localizado na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP). Posteriormente, os cromatogramas foram checados, e as sequências foram editadas e alinhadas no software Sequencher v.4.0.1. Uma sequência consenso do fragmento do gene COI com tamanho de 611 pb, formado pelo sequenciamento Forward e Reverse, para cada indivíduo foi construído para formar um arquivo FASTA. Em seguida, as sequências editadas usando o algoritmo ClustalW (parâmetros padrão) foram realinhadas dentro de software Mega X (KUMAR et al., 2018) formando o dataset\_1 com 59 sequências de *Gonipterus* originadas do Brasil.

### 3.2.3. Identificação molecular

O dataset\_1 foi submetido a análise de identificação dos haplótipos no software DnaSP v6.12.01 (ROZAS et al., 2017). Posteriormente, um dataset\_2 formado pelos haplótipos encontrados no Brasil de *Gonipterus* sp. e por sequências homólogas de COI do complexo críptico *G. scutellatus* disponíveis no GenBank previamente geradas por MAPONDERA et al. (2012) (números de acesso no apêndice: Tabela A.2) foi construído. Incluíram-se sequências das espécies *G. scutellatus*, *G. platensis*, *G. pulverulentus*, *Gonipterus* sp.n. 1, *Gonipterus* sp.n. 2, *Gonipterus* sp.n. 3, *Gonipterus* sp.n. 4, *G. balteatus*, *Oxyops pictipennis* e *Haplonyx* sp. (outgroup) (Coleoptera: Curculionidae). Posteriormente, foi contruída uma árvore filogenética bayesiana com intuito de confirmar a identificação das espécies de *Gonipterus* no Brasil. Utilizando o modelo HKY proposto por Hasegawa et al. (1985) e os parâmetros +I+G. O melhor modelo de substituição nucleotídica e parâmetros para análise filogenética foi encontrado utilizando-se o software MrModeltest2 v2.4 (NYLANDER, 2004). A construção da árvore teve suporte entre os nós dos ramos gerados de 20 milhões de repetições, e foi realizada utilizando o programa MrBayes (HUELSENBECK e RONQUIST, 2001).

### 3.2.4. Construção de primers específicos para identificação das espécies *Gonipterus* presentes no Brasil

Após as análises filogenéticas e confirmação da presença de duas espécies de *Gonipterus* no Brasil, *G. platensis* e *G. pulverulentus*, foi utilizado o dataset\_2 como molde para construir quatro primers que amplificam o gene COI de maneira diferente para as duas espécies. Assim, para *G. pulverulentus*, os primers geraram dois fragmentos de tamanhos de 438 pb e 241 pb, provenientes do anelamento dos primers Gpul\_F e Gpul\_R e Gpul\_F e Guni\_R, respectivamente. Já para *G. platensis*, os primers geraram apenas um fragmento de 222 pb oriundo do anelamento dos primers Gpla\_F e Guni\_R (**Tabela 3.2**).

**Tabela 3.2.** Primers desenvolvidos para a identificação molecular de *G. platensis* e *G. pulverulentus* através de reação de PCR

Primer	Sequência (5'-3')	Espécie(s) amplificada(s)
Gpul_F	GGTATAGATGTAGATACGCGG	<i>G. pulverulentus</i>
Gpul_R	CGAGTACCGTGCAGGTATTCCTCTTAAT	<i>G. pulverulentus</i>
Gpla_R	TGAATATCGTCGAGGTATACCTCTTAAC	<i>G. platensis</i>
Guni_F	CATGATACTTATTATGTAGTTGCTC	<i>G. pulverulentus</i> e <i>G. platensis</i>

### 3.2.5. Diversidade e demografia molecular de *G. platensis* no Brasil

As análises de estrutura populacional e demográficas foram realizadas para a espécie *G. platensis*, pois *G. pulverulentus* apresentou baixa distribuição no Brasil e ausência de diversidade na região COI amplificada. Assim, foi construído um dataset\_3 com todas as sequências de *G. platensis* (n = 51) oriundas de indivíduos brasileiros para as análises filogeográficas posteriores.

Inicialmente, foram estimados o número de haplótipos (H), a diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e o número de diferenças nucleotídicas (k) no programa DnaSP v6.12.01 (ROZAS et al., 2017). As relações genealógicas de *G. platensis* entre as sequências do fragmento do gene mitocondrial COI foram visualizadas estabelecendo uma rede de haplótipos. Construiu-se a rede de haplótipos pelo método Median Joining através do software PopArt v1.7 (LEIGH e BRYANT, 2015).

Posteriormente, uma análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada no software Arlequin v3.1 (EXCOFFIER et al., 2005), aplicando 5.000 réplicas para os parâmetros de bootstrap e 5 % de significância. Essas análises foram conduzidas para verificar a presença de estrutura genética entre os indivíduos, considerando todas as localidades amostradas (análise não-hierárquica) e entre as populações de acordo com a região geográfica de coleta.



Também efetuou-se os testes de neutralidade D de Tajima e  $F_s$  de Fu utilizando o Arlequin v3.1 (EXCOFFIER et al., 2005), em ambos os testes foram utilizados 1.000 permutações usando simulações de coalescência. Considerou-se a significância dos dados para a estatística de  $F_s$  de Fu em 95 % e p-valor menor que 0,02. Esses dois testes de neutralidade são fundamentados no modelo de sítios infinitos sem recombinação e distinguem padrões de mutações casuais neutras das não aleatórias provenientes de expansão populacional ou seleção. Valores negativos e significativos de D ou  $F_s$  indicam abundância de polimorfismos de baixa frequência e suportam a hipótese de expansão populacional ou de seleção purificadora, já valores positivos e significativos de D ou  $F_s$  significa que os polimorfismos de baixa frequência são menores que o esperado e apontam para fenômenos de gargalo genético ou de equilíbrio de seleção. Os valores não significativos são consistentes com a hipótese evolução neutra do DNA.

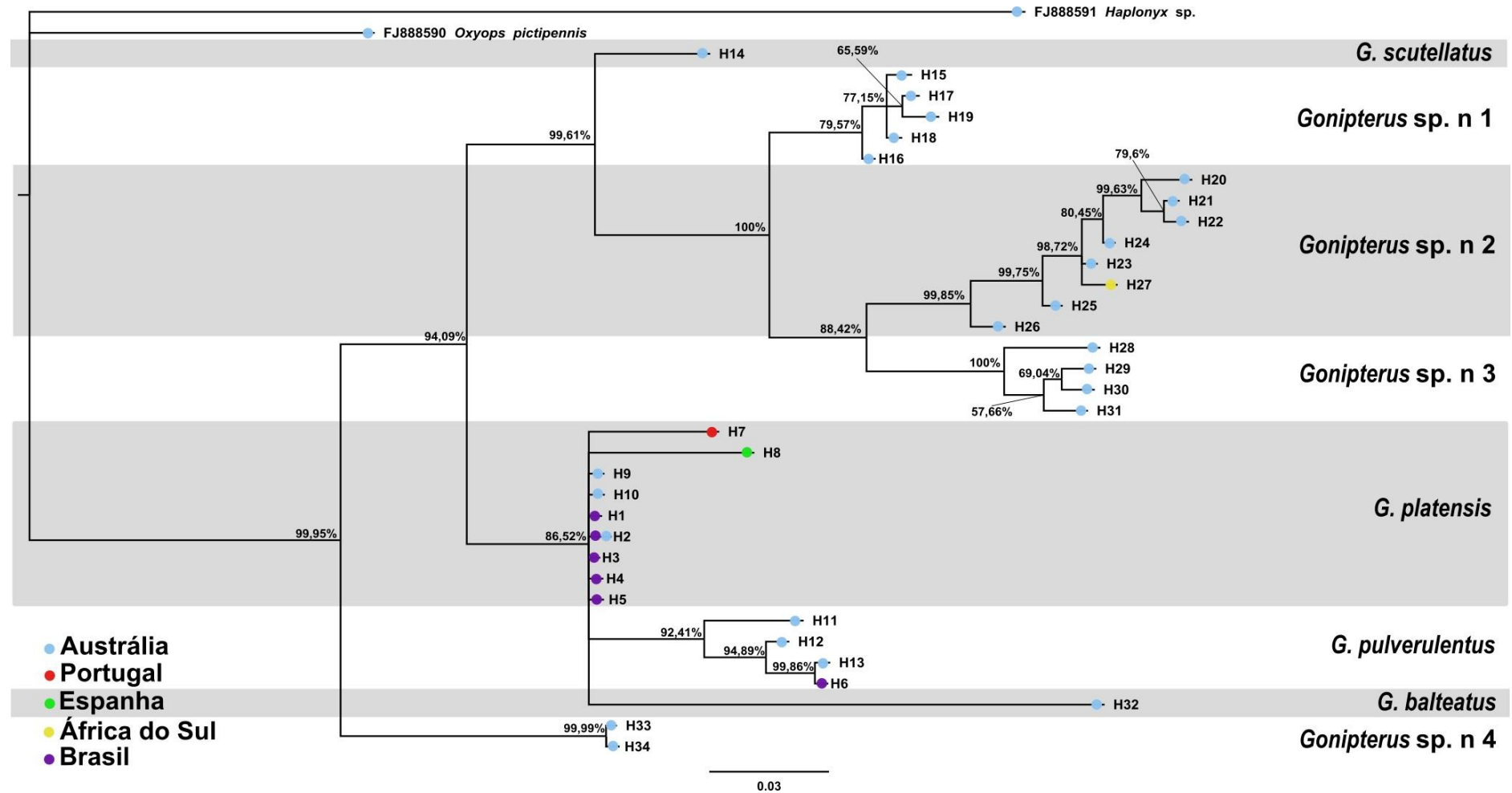
Conduziu-se uma análise de distribuição mismatch usando um modelo de expansão espacial. A soma dos quadrados dos desvios (SSD), estatísticas do índice de Raggedness (R) e seu p-valor associado também foram calculados usando o Arlequin v.3.1. Um valor SSD não significativo significa que a hipótese de expansão populacional não pode ser rejeitada, e um R não significativo indica um bom ajuste dos dados ao modelo de expansão espacial. Desta forma, populações em equilíbrio longo e estável devem apresentar um padrão unimodal, enquanto que populações que experimentaram uma expansão recente apresentam geralmente uma distribuição multimodal (ROGERS & HARPENDING, 1992). A análise de distribuição mismatch foi realizada testando os modelos para as populações como um todo (Brasil).

### **3.3. RESULTADOS**

#### **3.3.1. Identificação molecular de *Gonipterus* spp. no Brasil**

A análise filogenética realizada com os haplótipos de *Gonipterus* presentes no Brasil e das espécies crípticas do complexo *G. scutellatus* presentes na Austrália e outras regiões do mundo confirmaram a presença de duas espécies no Brasil, *G. platensis* e *G. pulverulentus* (Figura 3.1). A análise filogenética também revelou a presença de um haplótipo compartilhado de *G. platensis* entre o Brasil e a Austrália

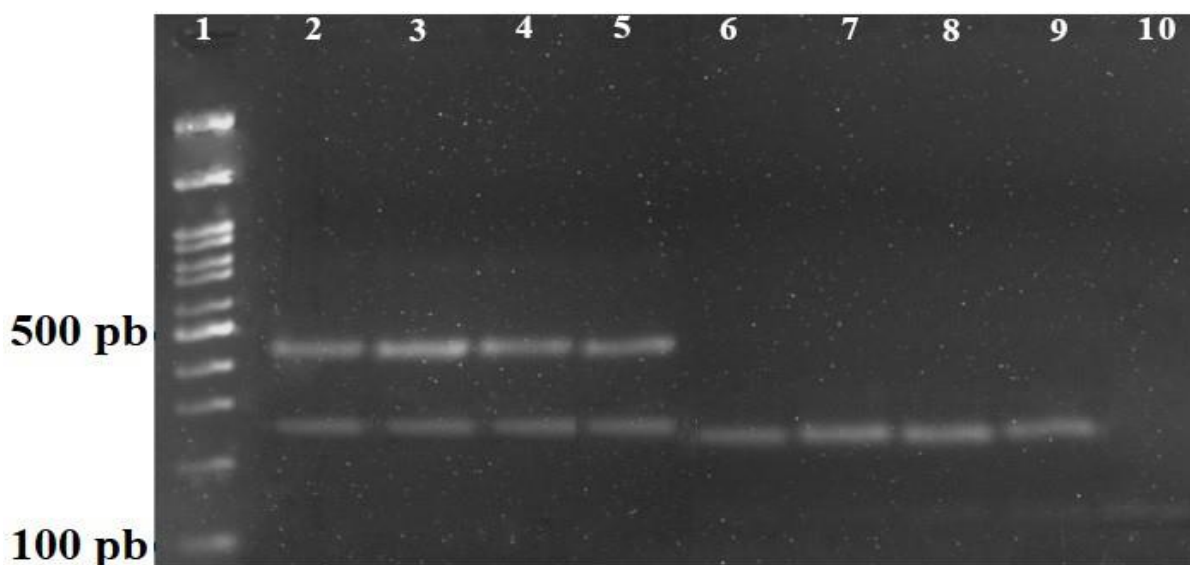
(H2) e maior distância genética com *G. platensis* presentes em países da Europa. O haplótipo H6, de *G. pulverulentus*, encontrado no Brasil, está filogeneticamente próximo ao haplótipo H13 da Austrália. Nenhum haplótipo brasileiro ficou filogeneticamente próximo às outras espécies do complexo além das espécies já reportadas no país (**Figura 3.1**).



**Figura 3.1.** Árvore bayesiana de *Gonipterus* spp. haplótipos com probabilidades posteriori para cada nó / ramo com base em seqüências de fragmentos do gene COI. Valores de suporte de nó abaixo de 0,50 (probabilidade posteriori) não foram registrados na árvore. As seqüências adicionais e informações de haplótipos (número do GenBank) são fornecidas como informações de apoio nas Tabela A.2. do Apêndice.

### 3.3.2. Marcador espécie específico para *G. platensis* e *G. pulverulentus* e sua distribuição no Brasil

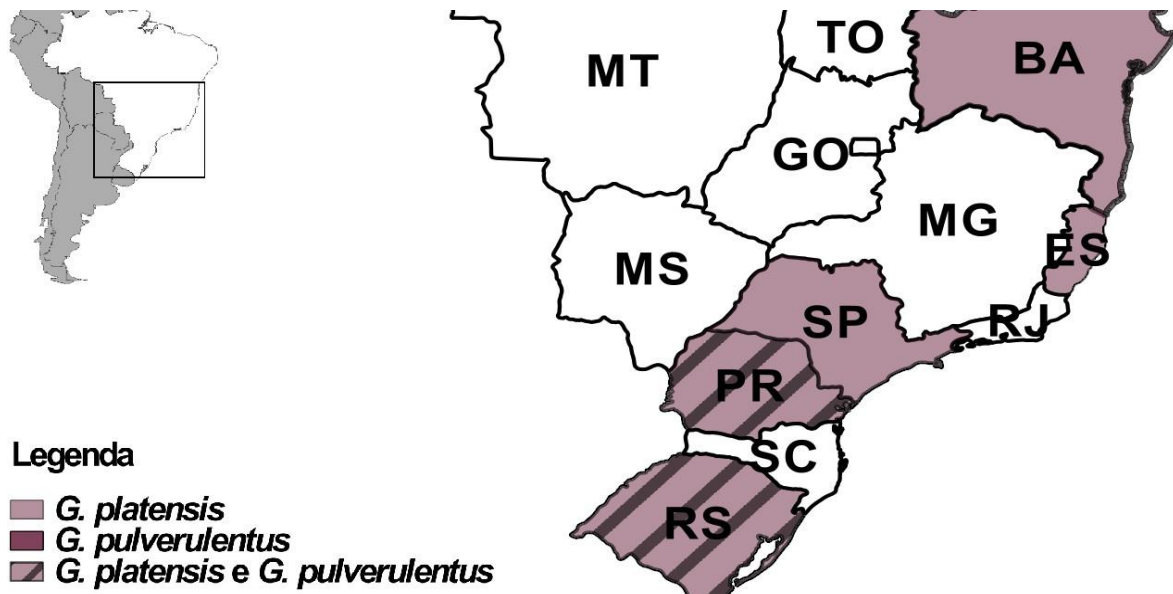
As amplificações do fragmento do gene COI pela reação multiplex utilizando os primers espécie-específicos foram congruentes com os resultados de sequenciamento, possibilitando a identificação molecular das espécies *G. platensis* e *G. pulverulentus* por meio desse método. Observa-se nos géis de agarose que *G. pulverulentus* gera dois fragmentos de tamanhos de 438 pb e 241 pb provenientes do anelamento dos primers Gpul\_F e Gpul\_R e Gpul\_F e Guni\_R, respectivamente. Já *G. platensis* apresenta apenas um fragmento visível de 222 pb oriundo do anelamento dos primers Gpla\_F e Guni\_R (**Figura 3.2**).



**Figura 3.2.** Gel de agarose 2 % mostrando fragmentos amplificados do gene COI através de uma reação multiplex com 4 primers espécie-específicos. Lane 1 corresponde ao marcador molecular de DNA (a banda mais intensa representa o fragmento de 500 pb); lanes de 2 a 5: *G. pulverulentus*; lanes de 6 a 9: *G. platensis*; lane 10: controle negativo (H<sub>2</sub>O).

Esse marcador permitiu a delimitação da ocorrência das espécies de *Gonipterus* spp. nas áreas amostradas. Detectou-se *G. platensis* em todas as áreas amostradas: 100 % dos indivíduos coletados em São Paulo (SP) (n = 26); 100% no Espírito Santo (ES) (n = 10); 100 % na Bahia (BA) (n = 14); 87,5% no Paraná (PR) (n

= 12); e 51,4% no Rio Grande do Sul (RS) (n = 22). Consequentemente, encontrou-se *G. pulverulentus* no RS e PR, nas respectivas porcentagens de 48,6% (n = 17) e 12,5% (n = 2) (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Distribuição das espécies de *Gonipterus* spp. nos cinco estados amostrados.

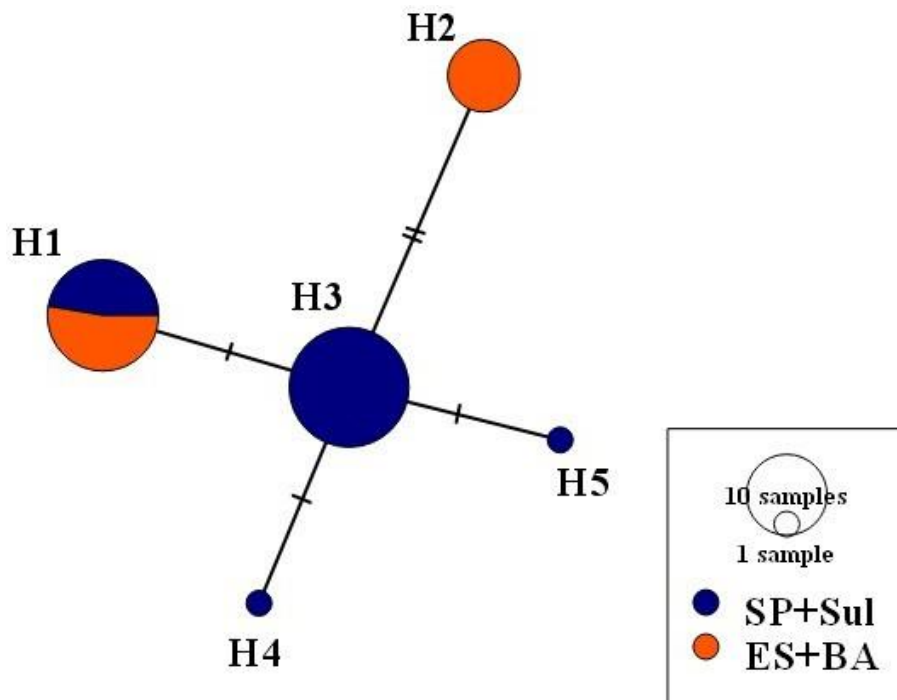
### 3.3.3. Análise de diversidade, estrutura e demografia

Os indivíduos sequenciados da espécie *G. pulverulentus* não apresentaram diversidade para o gene mitocondrial Citocromo c Oxidase Subunidade I, representando somente um haplótipo localizado no Sul do Brasil. Já a espécie *G. platensis*, obteve um total de 5 haplótipos evidenciados em 51 indivíduos ( $H = 5$ ). O valor de sua diversidade haplotípica ( $H_d$ ) foi 0,663 e da diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) de 0,00179. Os índices de diversidade para cada localidade separadamente estão dispostos na tabela 3.3.

**Tabela 3.3.** Índices de diversidade, número de haplótipos e sua distribuição para as populações de *Gonipterus platensis* no Brasil, calculados a partir do sequenciamento de um fragmento mtDNA citocromo c oxidase subunidade I (COI)

Localização (Cidade, Estado)	Código	N	Haplótipos de mtDNA (N)	Diversidade haplotípica (Hd)	Diversidade nucleotídica ( $\pi$ )
Mucuri, BA	BAMU	9	H1(5), H2(4)	0,556	0,00273
São Mateus, ES	ESSM	9	H1(5), H2(4)	0,556	0,00273
Itararé, SP	SPIT	11	H1(3), H3(8)	0,436	0,00071
Itirapina, SP	SPTI	8	H1(2), H3(6)	0,429	0,00070
Telêmaco Borba, PR	PRTB	4	H3(4)	0	0
Não informada, RS	HFNV	4	H3(3), H4(1)	0,500	0,00082
Arroio dos Ratos, RS	RSAR	6	H1(4), H3(1), H5(1)	0,600	0,00142
<b>Total</b>		<b>51</b>	<b>H1(19), H2(8) H3(22), H4(1), H5(1)</b>	<b>0,663</b>	<b>0,00179</b>

As relações genealógicas entre os cinco haplótipos encontrados mostram que não existe a presença de haplogrupos devido a pequena distancia genética entre os haplótipos. Os haplótipos mais frequentes foram os haplótipos H3 e H1. O H3 está separado por um passo mutacional dos demais haplótipos com exceção do haplótipo H2, do qual está separado por dois passos mutacionais. O haplótipo H1 está separado do haplótipo H4 por dois passos mutacionais, e por três passos do H2. No grupo ES+BA, que contém as populações ESSM e BAMU, estão presentes os haplótipos H1 e H2, já no grupo SP+Sul todos haplótipos estão presentes com a exceção do haplótipo H2 (**Figura 3.4**).



**Figura 3.4.** Rede de haplótipos com base na sequência de fragmentos do gene Citocromo c Oxidase Subunidade I (COI) para 51 indivíduos de *G. platensis*.

A análise de variância molecular (AMOVA), analisada para os haplótipos de *G. platensis* considerando todas populações sugere a presença de uma estruturação entre as populações de *G. platensis* (80,44%,  $\Phi_{ST} = 0,196$ ) (**Tabela 3.4.**). Quando consideramos a distância geográfica para dividir as populações de *G. platensis* em dois grupos: populações mais ao Norte (Grupo ES+BA) e as populações mais ao Sul (Grupo SP+Sul) do Brasil, podemos observar que grande parte da variação foi explicada entre grupos ( $\Phi_{CT} = 0,335$ ) (**Tabela 3.4.**). Essa informação sugere que as populações de *G. platensis* no Brasil estão estruturadas espacialmente nos cultivos de eucalipto do Brasil.

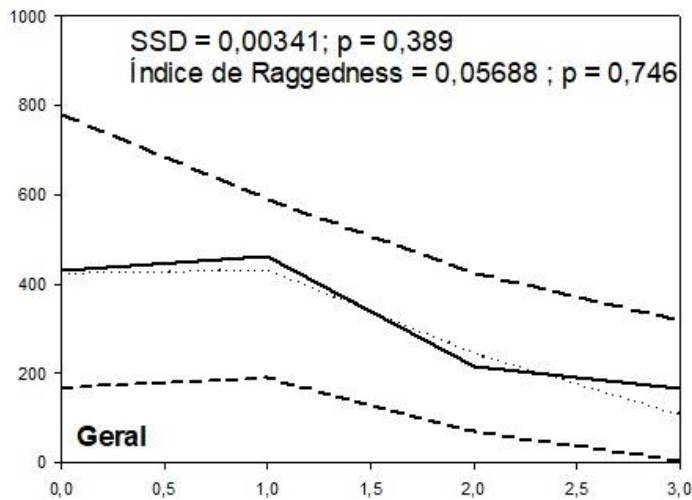
**Tabela 3.4.** Análise de variância molecular (AMOVA) para estrutura genética de populações de *Gonipterus platensis* utilizando o marcador mitocondrial Citocromo c Oxidase Subunidade I (COI).

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Componente de variância	Variância (%)	Índice de fixação (p-valor)
<b>Geral</b>					
Entre populações	6	7,441	0,11018 Va	19,56	$\Phi_{ST} = 0,196$ P = 0,00489
Dentro das populações	44	19,932	0,45300 Vb	80,44	
Total	50	27,373			
<b>Grupo ES+BA vs. SP+Sul</b>					
Entre grupos	1	5,54	0,22304 Va	33,54	$\Phi_{CT} = 0,335$ P = 0,04399
Entre populações dentro de regiões	5	1,886	-0,01103 Vb	-1,66	$\Phi_{SC} = -0,025$ P = 0,04692
Dentro das regiões	44	19,932	0,45300 Vc	68,12	$\Phi_{ST} = 0,319$ P = 0,00293
Total	50	27,373			

Os testes de neutralidade, D de Tajima e Fs de Fu, não foram significativos para uma análise geral das populações de *G. platensis*. Apresentando valores de -0,035 (p = 0,518) e 0,156 (p = 0,546) para D de Tajima e Fs de Fu, respectivamente. Estes resultados indicam que os polimorfismos encontrados estão de acordo com o modelo de neutralidade proposto por TAJIMA (1989) e que as populações de *G. platensis* analisadas, de maneira geral, não se encontram em condições expansão populacional (FU, 1997).

Os gráficos de distribuição mismatch para os valores observados e simulados para expansão espacial não foram significativos para os indivíduos de *G. platensis* quando avaliados como um todo (SSD < 0,003, p > 0,38; Raggedness < 0,056, p > 0,74) sugerindo uma expansão espacial dentro do território brasileiro (**Figura 3.5**).





**Figura 3.5.** Distribuição espacial de mismatch para os indivíduos de *G. platensis* como um todo. As análises foram geradas com intervalo de confiança de 95% e 1000 replicações de bootstrap. Linhas sólidas representam os valores observados; linhas pontilhadas os valores esperados e linhas interrompidas o intervalo de confiança à 95%. SSD = Soma do desvio do quadrado.

### 3.4. DISCUSSÃO

Devido à alta variabilidade interespecífica presente no genoma mitocondrial, a utilização de ferramentas moleculares se tornou amplamente difundida para identificações de espécies do Reino Animal (HEBERT et al., 2003). Nos insetos, por exemplo, o sequenciamento do gene COI possibilita a identificação de espécies em casos em que somente a identificação morfológica pode não ser suficiente, como nos casos de identificação de insetos em estágios imaturos (HAUSMANN et al., 2020; LI et al., 2020); reconhecimento de espécies crípticas (PAKRASHI et al., 2020; YANG et al., 2016); identificação de linhagens/raças (ASSEFA, 2019, SOARES et al., 2018); identificações de insetos em conteúdo intestinal de predadores (JUEN & TRAUGOTT, 2005; NANINI et al., 2019); entre outros.

No caso do complexo *G. scutellatus*, o sequenciamento do gene COI confirmou com grande acurácia a presença de duas espécies de *Gonipterus* no Brasil, *G. platensis* e *G. pulverulentus*. *G. platensis* é a espécie mais encontrada fora de sua região de origem (Tasmânia, Austrália), estando hoje, distribuída em cinco continentes: Oceania (Nova Zelândia) (MILLER, 1927); América do Sul (Argentina, Brasil, Chile, Colômbia e Uruguai) (EPPO, 2005; JEGGER et al., 2018); América do Norte (Califórnia e Havaí - Estados Unidos) (HAINES, 2006; PAINE & MILLAR, 2002);

África (África do Sul) (ECHEVERRI et al., 2007) e Europa (Portugal e Espanha) (EPPO, 2005; SÁNCHEZ GARCIA et al., 2009). Em seguida, a espécie invasora, também de origem australiana (aparentemente ausente no estado insular da Tasmânia), denominada como *Gonipterus* sp. n. 2, encontrada no continente africano (África do Sul, Ilhas Maurício, Lesoto, Madagascar, Malawi, Moçambique, Quênia, Santa Helena, Suazilândia, Uganda e Zimbábue) (EPPO, 2005; KEVAN, 1946; MAPONDERA et al., 2012; RICHARDSON & MEAKINS, 1986) e no continente europeu (França e Itália) (EPPO, 2005; MANSILLA VAZQUEZ, 1993; MAZZA et al., 2015). E por fim, *G. pulverulentus*, é a espécie do complexo *G. scutellatus* menos distribuída mundo, endêmica da Austrália (Nova Gales do Sul e Tasmânia), está presente somente no continente sul-americano, mais especificamente na Argentina, Brasil e Uruguai (EPPO, 2005). O compartilhamento de haplótipos e a baixa distância genética entre os indivíduos brasileiros de *G. platensis* e *G. pulverulentus* e aqueles encontrados na Austrália sugere que a origem geográfica das populações brasileiras é a Austrália e não outras regiões invadidas como Europa e África do Sul, assim como reportado para outras pragas florestais (NUGNES et al., 2015 ; SANTOS et al., 2020;) e para pragas agrícolas presentes no território brasileiro (CORDEIRO et al., 2019; FERRONATO et al., 2019).

Métodos baseados em reações de cadeia da polimerase (PCR) com utilização de primers espécie-específicos também foram desenvolvidos e são utilizados hoje, de maneira prática, em identificações de espécies reduzindo custos de sequenciamento e aumentando a agilidade na identificação (CORRÊA et al., 2013; PHUNNGAM et al., 2017; WU et al., 2016; ZHENG et al., 2019). As espécies de *Gonipterus* presentes hoje no Brasil fazem parte de um complexo de espécies crípticas (MAPONDERA et al., 2012) e compartilham, além das semelhanças morfológicas, similaridades ecológicas, como hospedeiros (EPPO, 2005; JEGER et al., 2018). E nesse trabalho desenvolveu-se um marcador molecular baseado na utilização de primers espécie-específicos que identificam com êxito as espécies *G. platensis* e *G. pulverulentus* por meio de uma reação multiplex de PCR. Esse marcador será útil para o monitoramento futuro da distribuição das espécies, bem como, identificação de espécies submetidos a bioensaios de biologia, ecologia e no desenvolvimento de processos e métodos de controle dessas pragas no Brasil.

A distribuição de *Gonipterus* spp. no Brasil foi obtida pela utilização do marcador molecular, aqui desenvolvido, em todos os indivíduos provenientes das

coletas de campo, identificando 103 indivíduos. Os resultados revelaram que a espécie *G. platensis* é aquela mais amplamente distribuída no território brasileiro. Enquanto *G. pulverulentus* está restrita a região Sul do Brasil, ocorrendo simultaneamente com *G. platensis* nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná. Aqui, o primeiro registro da presença de *G. platensis* no estado da Bahia, onde até o momento não possuía relato da presença do gorgulho-do-eucalipto. A distribuição de *G. platensis* e *G. pulverulentus* sugere está associada a condições climáticas, onde *G. platensis* seja capaz de adaptar-se a uma maior amplitude climática ocorrendo em todo o território brasileiro, enquanto *G. pulverulentus* é restrita a regiões mais frias do continente sul-americano com relatos de ocorrência na Argentina e Uruguai (EPPO, 2005; MAPONDERA et al., 2012).

Analisando a diversidade haplotípica (Hd) e nucleotídica ( $\pi$ ) de *Gonipterus* spp. não se detectou diversidade para a espécie *G. pulverulentus*. Isso pode ter ocorrido pelo baixo número de sequências obtidos ( $n = 8$ ) e pelas sequências se restringirem às populações do Rio Grande do Sul (HFNV e RSAR). Sugere-se ainda, que a baixa diversidade encontrada é devido a um número efetivo pequeno das populações de *G. pulverulentus* no Brasil em decorrência de um evento de invasão ou baixo potencial adaptativo da espécie no território brasileiro, uma vez que a ocorrência da espécie é restrita ao Sul do Brasil.

Em *G. platensis* os valores detectados foram medianos, para Hd, e baixos para  $\pi$ , indicando um modelo de rápida expansão geográfica (GRANT & BOWEN, 1998). As inferências genealógicas analisadas pela rede de haplótipos e árvore filogenética mostram uma baixa diversidade genética entre os haplótipos encontrados, sendo o haplótipo H1 o haplótipo mais distribuído espacialmente entre as regiões brasileiras. Acredita-se que *G. platensis* esteja presente no Brasil desde 1979 (FREITAS, 1979), tendo sido encontrado em Curitiba, PR. Posteriormente essa espécie foi reportada em Lages - SC, no ano de 1982 (FENILLI, 1982), em Itararé - SP (1992) (ROSADO-NETO, 1993) e no Espírito Santo - ES em 2008 (WILCKEN et al., 2008). Neste trabalho reporta-se pela primeira vez a ocorrência de *G. platensis* no estado da Bahia (BA) através das coletas realizadas entre 2019/20. A ausência de relatos de *G. platensis* no estado de Minas Gerais - MG é intrigante, uma vez que a expansão natural de indivíduos de *G. platensis* para o estado do ES e BA necessitaria da colonização do estado de MG. Porém, através de relatos pessoais, descobriu-se que as mudas de implementação de eucalipto que estão presentes no estado do ES foram provenientes

do estado do Rio Grande do Sul, o que se faz considerar que a introdução do gorgulho nesse estado tenha sido feita de maneira antrópica e não pela dispersão natural da espécie.

Os testes de neutralidade não significativos sugerem que as populações de *G. platensis* não estão em expansão populacional, indicando que as populações não estão em crescimento de número efetivo e que haplótipos exclusivos e de baixa frequência não são encontrados com frequência no Brasil. Já teste de mismatch apontam que existe uma expansão espacial das populações de gorgulho-do-eucalipto no Brasil (resultados não significativos de SSD e Índice de Raggedness), provavelmente pela expansão recente para as regiões que compreendem o sudeste e nordeste do território brasileiro.

As análises de variância molecular (AMOVA) revelaram que boa parte da variabilidade de *G. platensis* está presente entre os grupos (SP+Sul e ES+BA) das populações mais ao Norte e as mais ao Sul do Brasil ( $\Phi_{CT} = 0,335$ ), apesar da recente expansão da eucaliptocultura para os estados mais ao Norte do país (IBÁ, 2020). Esse fato sugere que as populações de *G. platensis* se movimentam pouco a longa distâncias e que os haplótipos foram fixados em diferentes frequências (provavelmente por deriva genética) nas regiões mais ao Sul e mais ao Norte do Brasil. Porém esse processo de invasão é acelerado pela dispersão antrópica. Isso implica que as populações de *G. platensis* estão evoluindo de maneira distinta entre as regiões brasileiras com possíveis impactos em aspectos ecológicos e biológicos que poderiam influenciar no manejo dessa praga em áreas de florestas plantadas no Brasil.

## REFERÊNCIAS

- ABRAF (2006). ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS Anuário estatístico da ABRAF 2006: ano base 2005. Technical report, Brasília.
- ANDERSON, C. J., TAY, W. T., McGAUGHRAN, A., GORDON, K., e WALSH, T. K. (2016). Population structure and gene flow in the global pest, *Helicoverpa armigera*. *Molecular Ecology*, 25(21):5296–5311.

- ARACRUZ (2006). Ascensão e queda do gorgulho. In ARACRUZ, editor, *REUNIÃO TÉCNICA PROTEF, 9, 2006, Aracruz. Avanços da pesquisa na proteção florestal*, 27 p. Aracruz.
- ASSEFA, Y. (2019). Molecular identification of the invasive strain of *Spodoptera frugiperda* (JE smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in Swaziland. *International Journal of Tropical Insect Science*, 39(1):73–78.
- AVISE, J. C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36(1):3–15.
- AVISE, J. C., ARNOLD, J., BALL, R. M., BERMINGHAM, E., LAMB, T., NEIGEL, J. E., REEB, C. A., e SAUNDERS, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18(1):489–522.
- BRADSHAW, C. J. A., LEROY, B., BELLARD, C., ROIZ, D., ALBERT, C., FOUR-NIER, A., BARBET-MASSIN, M., SALLES, J.-M., SIMARD, F., e COURCHAMP, F. (2016). Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects. *Nature Communications*, 7(1):12986.
- CAO, L. J., WANG, Z. H., GONG, Y. J., ZHU, L., HOFFMANN, A. A., e WEI, S. J. (2017). Low genetic diversity but strong population structure reflects multiple introductions of western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) into China followed by human-mediated spread. *Evolutionary Applications*, 10(4):391–401.
- CHOUPINA, A. B. e MARTINS, I. M. (2015). Molecular markers for genetic diversity, gene flow and genetic population structure of freshwater mussel species. *Brazilian Journal of Biology*, 74(3 suppl 1):s167–s170.
- CORRÊA, A. S., ORLANDO de OLIVEIRA, L., BRAGA, L. S., e GUEDES, R. N. C. (2013). Distribution of the related weevil species *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* in Brazil. *Insect Science*, 20(6):763–770.
- ECHEVERRI, D., SLIPPERS, B., HURLEY, B. P., e WINGFIELD, M. J. (2007). Population diversity and structure of the Eucalyptus Snout-Beetle, *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera, Curculionidae) in South Africa, Spain, Chile and Uruguay. Proceedings of the IUFRO 2007 Working Group 2.08.03 Meeting “Eucalypts and Diversity: Balancing Productivity and Sustainability”; 22–26 October, 2007; Durban, South Africa. EPPO (2005). *Gonipterus gibberus* and *Gonipterus scutellatus*. EPPO Bulletin, 35(3):368–370.

- EXCOFFIER, L., LAVAL, G., e SCHNEIDER, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1:47–50.
- FENILLI, R. (1982). Primeiro registro de *Gonipterus platensis* Marelli, 1926 e *Gonipterus gibberus* (Boisduval, 1835) (Coleoptera, Curculionidae, Gonipterinae) no estado de Santa Catarina, Brasil. *Anais de Sociedade Entomológica do Brasil*, 11(2):293–294.
- FERRONATO, P., WOCH, A. L., SOARES, P. L., BERNARDI, D., BOTTON, M., OLIVEIRA, E. E., e CORRÊA, A. S. (2019). A phylogeographic approach to the *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) invasion in Brazil. *Journal of Economic Entomology*, 112(1):425–433.
- FREELAND, J. (2011). *Molecular ecology*. Oxford Wiley-Blackwell Hoboken, NJ, Oxford Hoboken, NJ, 2nd edition.
- FREITAS, S. (1979). Contribuição ao estudo da morfologia e biologia de *Gonipterus gibberus* (Boisduval, 1835) (Coleoptera, Curculionidae) e levantamento dos danos causados por esta espécie em eucaliptos dos arredores de Curitiba. Tese (mestrado em entomologia), Universidade Federal do Paraná.
- FREITAS, S. (1991). Biologia de *Gonipterus gibberus* (Boisduval, 1835) (Coleoptera, Curculionidae) uma praga de eucaliptos. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 20(2):339–344.
- FU, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2):915–925.
- GARNAS, J., CHUNGHU, D., HURLEY, B. P., e SLIPPERS, B. (2011). Cryptic diversity in the *Eucalyptus* snout beetle swarms that of its biocontrol agent, *Anaphes nitens*, in South Africa. Austin, Texas.
- GONÇALVES, C. I., VILAS-BOAS, L., BRANCO, M., REZENDE, G. D., e VALENTE, C. (2019). Host susceptibility to *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) of *Eucalyptus* species. *Annals of Forest Science*, 76(3).
- GRANT, W. S. e BOWEN, B. W. (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89(5):415–426.

- HAINESS, W. P. (2006). The Eucalyptus snout beetle, *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera: Curculionidae) recently established in the Hawaiian Islands. In EVENHUIS, N. e ELDREDGE, L., editors, *Records of the Hawaii biological survey for 2004-2005 Part2: Notes*, pages 25–26. Bishop Museum Occasional Papers, volume 88.
- HASEGAWA, M., KISHINO, H., e YANO, T.-a. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22(2):160–174.
- HAUSMANN, A., DILLER, J., MORINIERE, J., HÖCHERI, A., FLOREN, A., e HASZ-PRUNAR, G. (2020). DNA barcoding of fogged caterpillars in Peru: A novel approach for unveiling host-plant relationships of tropical moths (Insecta, Lepidoptera). *PLOS ONE*, 15(1):e0224188.
- HEBERT, P. D. N., CYWINSKA, A., BALL, S. L., e DEWAARD, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512):313–321.
- HUELSENBECK, J. P. e RONQUIST, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8):754–755.
- IBÁ (2020). Relatório anual 2020 - Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ). Technical report.
- JEGER, M., BRAGARD, C., CAFFIER, D., CANDRESSE, T., CHATZIVASSILIOU, E., DENHEN-SCHMUTZ, K., GILIOLO, G., JAQUESS MIRET, J. A., MACLEOD, A., NAVAJAS NAVARRO, M., NIERE, B., PARNELL, S., POTTING, R., RAFOSS, T., ROSSI, V., UREK, G., VAN BRUGEN, A., VAN DER WERF, W., WEST, J., WINTER, S., SANTOLAMAZZA-CARBONE, S., KERTÉSZ, V., AUKHOJEE, M., e GRÉGOIRE, J. (2018). Pest categorization of the *Gonipterus scutellatus* species complex. *EFSA Journal*, 16(1):5107.
- JUEN, A. e TRAUGOTT, M. (2005). Detecting predation and scavenging by DNA gut-content analysis: A case study using a soil insect predator-prey system. *Oecologia*, 142(3):344–352.
- KARLSSON GREEN, K., STENBERG, J. A., e LANKINEN, Å. (2020). Making sense of Integrated Pest Management (IPM) in the light of evolution. *Evolutionary Applications*, 13(8):1791–1805.

- KEVAN, D. K. (1946). The Eucalyptus Weevil in East Africa. *The East African Agricultural Journal*, 12(1):40–44.
- LANFRANCO, D. e DUNGEY, H. S. (2001). Insect damage in eucalyptus: A review of plantations in Chile. *Austral Ecology*, 26(5):477–481.
- LEE, C. E. (2002). Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(8):386–391.
- LEIGH, J. W. e BRYANT, D. (2015). Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9):1110–1116.
- LI, D., MCCARTHY, B., GUNAWARDANA, D. N., WAITE, D. W., ANDERSON, D., e GEORGE, S. (2020). Molecular identification of *Bactrocera passiflorae* (Diptera: Tephritidae): Challenge and solution for DNA barcoding. *Journal of Applied Entomology*, 144(10):877–884.
- LOCH, A. D. e MATSUKI, M. (2010). Effects of defoliation by Eucalyptus weevil, *Gonipterus scutellatus*, and chrysomelid beetles on growth of *Eucalyptus globulus* in southwestern Australia. *Forest Ecology and Management*, 260(8):1324–1332.
- LUQUE, G. M., BELLARD, C., BERTELSMEIR, C., BONNAUD, E., GENOVESI, P., SIMBERLOFF, D., e COURCHAMP, F. (2014). The 100th of the world's worst invasive alien species. *Biological Invasions*, 16(5):981–985.
- MANDAL, S. D., CHHAKCHHUAK, L., GURUSUBRAMANIAN, G., e KUMAR, N. S. (2014). Mitochondrial markers for identification and phylogenetic studies in insects – A Review. *DNA Barcodes*, 2(1):1-9.
- MANSILLA, J. P., SALINERO, M. C., e PÉREZ, R. (1995). Revisión 1994 de área de dispersión de *Gonipterus scutellatus* Gyll. en Galicia. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 21:277–280.
- MANSILLA VAZQUEZ, J. P. (1993). [Presence on *Eucalyptus globulus* Labill of *Gonipterus scutellatus* Gyll. (Col. Curculionidae) in Galicia]. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 18(3):547–554.
- MAPONDERA, T. S., BURGESS, T., MATSUKI, M., e OBERPRIELER, R. G. (2012). Identification and molecular phylogenetics of the cryptic species of the *Gonipterus scutellatus* complex (Coleoptera: Curculionidae: Gonipterini). *Australian Journal of Entomology*, 51(3):175–188.



- MAZZA, G., INGHILESI, A. F., TRICARICO, E., MONTAGNA, M., LONGO, S., e ROVERSI, P. F. (2015). First report of *Gonipterus scutellatus* complex (Coleoptera Curculionidae) in Sicily (Italy). *REDIA*, 98:149–150.
- MILLER, D. (1927). The gum-tree weevil and its parasites. *New Zealand Journal of Agriculture*, 35:283–289.
- NANINI, F., MAGGIO, D. H., FERRONATO, P., RUGNO, G., YAMAMOTO, P. T., e CORRÊA, A. S. (2019). Molecular marker to identify *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) DNA in gut content of predators. *Neotropical Entomology*, 48(6):927–933.
- NUGNES, F., GEBIOLA, M., MONTI, M. M., GUALTIERI, L., GIORGINI, M., WANG, J., e BERNARDO, U. (2015). Genetic diversity of the invasive gall wasp *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) and of its *Rickettsia* endosymbiont, and associated sex-ratio differences. *PLOS ONE*, 10(5):e0124660
- NYLANDER, J. A. A. (2004). MrModeltest v2 Program distributed by the author. Evolutionary Biology Center, Uppsala University.
- PAINE, T. e MILLAR, J. (2002). Insect pests of eucalypts in California: implications of managing invasive species. *Bulletin of Entomological Research*, 92(2):147–151.
- PAINI, D. R., SHEPPARD, A. W., COOK, D. C., DE BARRO, P. J., WORNER, S. P., e THOMAS, M. B. (2016). Global threat to agriculture from invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(27):7575–7579.
- PAKRASHI, A., KUNDU, S., SAINI, J., TYAGI, K., CHANDRA, K., e KUMAR, V. (2020). Molecular identification of selected bees from the Indian Himalaya: A preliminary effort. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23(4):883–889.
- PHUNNGAM, P., BOONKUE, U., CHAREONVIRIYAPHAP, T., BANGS, M. J., e ARUNYAWAT, U. (2017). Molecular identification of four members of the *Anopheles dirus* complex using the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 33(4):263–269.
- PIMENTEL, D., LACH, L., ZUNIGA, R., e MORRISON, D. (2000). Environmental and economic costs of nonindigenous species in the United States. *BioScience*, 50(1):53–65.
- RICHARDSON, K. F. e MEAKINS, R. H. (1986). Inter- and Intra- specific Variation in the Susceptibility of Eucalypts to the Snout Beetle *Gonipterus scutellatus* Gyll. (Coleoptera: Curculionidae). *South African Forestry Journal*, 139(1):21–31.

- ROGERS, A. R. e HARPENDING, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9(3):552– 569.
- ROSADO-NETO, G. H. (1993). Gonipterinae dos eucaliptos: Primeiro registro de *Gonipterus scutellatus* para o estado de São Paulo, Brasil, e algumas considerações sobre *G. gibberus* (Coleoptera, Curculionidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 37(3):465–467.
- ROZAS, J., FERRER-MATA, A., SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C., GUIRAO-RICO, S., LIBRADO, P., RAMOS-ONSINS, S. E., e SÁNCHEZ-GRACIA, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12):3299–3302.
- SAG - SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO (2015). Informativo Fitosanitario Forestal. Technical report, Santiago.
- SÁNCHEZ GARCIA, I., REINA BELINCHÓN, I., e HURTADO HERNÁNDEZ, A. (2009). Primeras observaciones para el suroeste ibérico del gorgojo del eucalipto (*Gonipterus scutellatus* Gyllenhal, 1833) (Coleoptera: Curculionidae) y de su parasitoide *Anaphes nitens* (Girault, 1928) (Hymenoptera: Myrmaride). *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas*, 35(3):419–422.
- SANTOS, F. A., CORRÊA, A. S., NANINI, F., NASCIMENTO, D. A., JUNQUEIRA, L. R., e WILCKEN, C. F. (2020). Genetic diversity of *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) and its parasitoid *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) in Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 81(3): 838-841.
- SCHLICK-STEINER, B. C., STEINER, F. M., SEIFERT, B., STAUFFER, C., CHRISTIAN, E., e CROZIER, R. H. (2010). Integrative Taxonomy: A Multisource Approach to Exploring Biodiversity. *Annual Review of Entomology*, 55(1):421–438.
- SCHRÖDER, M. L., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M. J., e HURLEY, B. P. (2020). Invasion history and management of *Eucalyptus* snout beetles in the *Gonipterus scutellatus* species complex. *Journal of Pest Science*, 93(1):11–25.
- SHOUCHE, Y. S. e PATOLE, M. S. (2000). Sequence analysis of mitochondrial 16S ribosomal RNA gene fragment from seven mosquito species. *Journal of Biosciences*, 25(4):361–366.

- SILLERO, N., HUEY, R. B., GILCHRIST, G., RISSLER, L., e PASCUAL, M. (2020). Distribution modelling of an introduced species: do adaptive genetic markers affect potential range? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 287(1935):20201791.
- SIMON, C., BUCKLEY, T. R., FRATI, F., STEWART, J. B., e BECKENBACH, A. T. (2006). Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved Polymerase Chain Reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37(1):545–579.
- SIMON, C., FRATI, F., BECKENBACH, A., CRESPI, B., LIU, H., e FLOOK, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6):651–701.
- SOARES, P. L., CORDEIRO, E. M. G., SANTOS, F. N. S., OMOTO, C., e CORRÊA, A. S. (2018). The reunion of two lineages of the Neotropical brown stink bug on soybean lands in the heart of Brazil. *Scientific Reports*, 8(1):2496.
- SOUZA, N. M., JUNQUEIRA, L. R., WILCKEN, C. F., SOLIMAN, E. P., de CAMARGO, M. B., NICKELE, M. A., e BARBOSA, L. R. (2016). Ressurgência de uma antiga ameaça: Gorgulho do Eucalipto *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae). *Circular Técnica IPEF*, 209:01–20.
- TAJIMA, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3):585–595.
- TOOKE, F. G. C. (1955). The Eucalyptus Snout-Beetle, *Gonipterus scutellatus* Gyll: a study of its ecology and control by biological means. Department of Agriculture, SA(1):1–282.
- WEI, S. J., CAO, L. J., GONG, Y. J., SHI, B. C., WANG, S., ZHANG, F., GUO, X. J., WANG, Y. M., e CHEN, X. X. (2015). Population genetic structure and approximate Bayesian computation analyses reveal the southern origin and northward dispersal of the oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) in its native range. *Molecular Ecology*, 24(16):4094–4111.
- WESTPHAL, M. I., BROWNE, M., MacKINNON, K., e NOBLE, I. (2008). The link between international trade and the global distribution of invasive alien species. *Biological Invasions*, 10(4):391–398.

- WILCKEN, C. F., SARTORIO, R., LOUREIRO, E., BEZERRA JUNIOR, N., e ROSADO NETO, G. (2008). Ocorrência de *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) em plantações de eucalipto no estado do Espírito Santo. *Arquivos do Instituto Biológico*, 75(1):113–115.
- WU, Y., LI, F., LI, Z., STEJSKAL, V., AULICKY, R., KUČEROVÁ, Z., ZHANG, T., HE, P., e CAO, Y. (2016). Rapid diagnosis of two common stored-product predatory mite species based on species-specific PCR. *Journal of Stored Products Research*, 69:213–216.
- YANG, C. Y., KIM, S-J., KWON, S-J., e AHN, S-J. (2016). Molecular identification of closely related mirine plant bugs, *Apolygus spinolae* and *A. lucorum* (Heteroptera: Miridae) by PCR-RFLP markers. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 19(3):729–734.
- ZHENG, L., ZHANG, Y., YANG, W., ZENG, Y., JIANG, F., QIN, Y., ZHANG, J., JIANG, Z., HU, W., GUO, D., WAN, J., ZHAO, Z., LIU, L., e LI, Z. (2019). New species-specific primers for molecular diagnosis of *Bactrocera minax* and *Bactrocera tsuneonis* (Diptera: Tephritidae) in China based on DNA barcodes. *Insects*, 10(12):447.



#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho analisou-se a diversidade do gene mitocondrial citocromo c oxidase, subunidade I e demografia de duas importantes pragas para a eucaliptocultura brasileira, uma nativa, a lagarta-parda-do-eucalipto de nome específico *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782)

(Lepidoptera: Geometridae), e outra exótica chamada de gorgulho-do-eucalipto que possui duas espécies no território brasileiro: *Gonipterus platensis* (Marelli, 1926) e *G. pulverulentus* Lea 1897.

As populações de *T. arnobia* apresentaram moderada diversidade mitocondrial e estabilidade demográfica. A análise de estrutura genética indicou baixa movimentação das populações de *T. arnobia* entre as regiões brasileiras, no entanto, é necessário um maior número de marcadores para validar os índices de estruturação genética e fluxo gênico entre as populações no Brasil, como por exemplos marcadores SNPs. As populações de *T. arnobia* presentes no Nordeste brasileiro estão em processo de expansão espacial que pode estar sendo causada pelo aumento da produção de eucalipto na área. Populações estruturadas indicam que as forças evolutivas locais são mais importantes do que o fluxo gênico e que os planos de manejo e a adoção de estratégias e táticas de controle devem ser consideradas com uma abrangência regional/local devido ao baixo fluxo de alelos entre as regiões brasileiras.

Para *Gonipterus* spp., os resultados demonstraram que foi possível identificar molecularmente as espécies crípticas *G. platensis* e *G. pulverulentus* por meio da utilização de primers específicos em uma reação de PCR multiplex e conseguinte visualização em gel de agarose. A identificação molecular também permitiu a delimitação da distribuição geográfica das duas espécies de gorgulho-do-eucalipto no Brasil, onde *G. platensis* é amplamente distribuída pelo território brasileiro e *G. pulverulentus* é restrita ao Sul do país. A utilização dessa ferramenta auxiliará nas identificações futuras dessas pragas possibilitando formulações de procedimentos de manejo e de medidas quarentenárias mais eficientes.

Os resultados de estruturação populacional de *G. platensis* revelaram que provavelmente a introdução dessa espécie no Brasil é oriunda de um único evento e que dentro do país. As populações de *G. platensis* apresentam baixa diversidade, no

entanto, essa diversidade está estruturada entre as regiões ao Sul e ao Norte do país de ocorrência da praga. As populações brasileiras, apesar de expansão espacial, não parecem estar em expansão demográfica no território brasileiro, se mantendo estáveis.

Os processos de invasão de *Gonipterus* spp. ao redor do mundo e as perdas já causadas à eucaliptocultura, faz-se ponderar sobre as medidas preventivas e quarentenárias necessárias para evitar o estabelecimento de novas espécies do complexo *G. scutellatus* dentro do país. Mesmo que o controle com o parasitoide de ovos *Anaphes nitens* seja consistentemente eficiente, é preciso enfatizar que o controle completo ainda não foi atingido no Brasil, e sempre existirão ameaças de novas invasões, que trazem consigo o potencial em gerar mudanças seletivas para essas espécies devido às pressões de seleção causadas pelos novos ambientes. Dessa forma, deve-se manter boas práticas silviculturais para impedir reintroduções, evitar introduções das espécies de *Gonipterus* spp. ainda ausentes no Brasil, e para frear o avanço natural do gorgulho-do-eucalipto para outros estados brasileiros.

## APÊNDICES

**Tabela A.1.** Distribuição dos hospedeiros nativos de *T. arnobia* por estado brasileiro de acordo com SiSBR, 2020

Espécie	NORTE							NORDESTE									CENTRO-OESTE				SUDESTE				SUL		
	AC	AM	AP	PA	RO	RR	TO	AL	BA	CE	MA	PB	PE	PI	RN	SE	DF	GO	MS	MT	ES	MG	RJ	SP	PR	RS	SC
<i>Campomanesia velutina</i> *							X	X	X	X				X	X		X	X	X			X		X			
<i>Campomanesia pubescens</i> *							X	X									X	X	X	X	X		X	X			
<i>Eugenia dysenterica</i> *							X	X	X			X	X														
<i>Eugenia uniflora</i> *								X													X	X	X	X	X	X	X
<i>Psidium guajava</i> *	X	X						X	X	X			X	X		X			X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Psidium rufum</i> *								X	X								X	X			X	X	X	X	X		
<i>Psidium myrsinoides</i> *							X	X	X								X	X			X	X	X	X	X	X	
<i>Citronella gongonha</i> (Icacinaceae)								X									X		X	X				X	X	X	X
<i>Illex paraguariensis</i> (Aquifoliaceae)								X									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Qualea grandiflora</i> (Vochysiaceae)	X	X		X	X		X	X	X				X					X	X	X		X		X	X		X
<i>Magonia pubescens</i> (Sapindaceae)				X			X	X	X				X				X	X	X	X		X		X			
<i>Byrsonima crispera</i> (Malpighiaceae)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X									X						
<i>Byrsonima basiloba</i> (Malpighiaceae)							X	X									X	X	X	X		X		X	X		

\*Família Myrtaceae



**Tabela A.1.** Distribuição dos hospedeiros nativos de *T. arnobia* por estado brasileiro de acordo com SiSBR, 2020 (continuação)

Espécie	NORTE							NORDESTE							CENTRO-OESTE				SUDESTE				SUL				
	AC	AM	AP	PA	RO	RR	TO	AL	BA	CE	MA	PB	PE	PI	RN	SE	DF	GO	MS	MT	ES	MG	RJ	SP	PR	RS	SC
<i>Vernonanthura patens</i> (Asteraceae)																	X					X					
<i>Peltophorum dubium</i> (Fabaceae)							X	X		X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
% total de presença de espécies por estado	19%	19%	6%	19%	12%	6%	50%	19%	87%	50%	50%	6%	19%	31%	12%	12%	50%	62%	56%	50%	50%	75%	44%	75%	62%	37%	37%

**Tabela A.2.** Haplótipo, país, código de acesso do GenBank e espécie das sequências dos fragmentos do gene COI utilizadas para a construção da árvore filogenética para as espécies do complexo *Gonipterus scutellatus*

Haplótipo (n)	País	Código de acesso GenBank	Espécie
H1 (19)	Brasil	BAMU01, BAMU02, BAMU05, BAMU08, BAMU09, ESSM03, ESSM04, ESSM06, ESSM07, ESSM08, RSAR05, RSAR06, RSAR12, RSAR13, SPIT01, SPIT02, SPIT12, SPTI13, SPTI15	<i>G. platensis</i>
H2 (9)	Austrália e Brasil	FJ888530, BAMU03, BAMU06, BAMU07, BAMU10, ESSM01, ESSM02, ESSM05, ESSM09	<i>G. platensis</i>
H3 (22)	Brasil	HFNV02, HFNV03, HFNV10, PRTB03, PRTB08, PRTB09, PRTB10, RSAR15, SPIT09, SPIT10, SPIT11, SPIT13, SPIT15, SPIT17, SPIT18, SPIT19, SPTI07, SPTI08, SPTI12, SPTI14, SPTI17, SPTI19	<i>G. platensis</i>
H4 (1)	Brasil	HFNV06	<i>G. platensis</i>
H5 (1)	Brasil	RSAR14	<i>G. platensis</i>
H6 (8)	Brasil	HFNV01, HFNV05, HFNV07, HFNV08, HFNV12, RSAR07, RSAR10	<i>G. pulverulentus</i>
H7 (1)	Espanha	JN391479	<i>G. platensis</i>
H8 (1)	Portugal	JN391480	<i>G. platensis</i>
H9 (1)	Austrália	JN391478	<i>G. platensis</i>
H10 (1)	Austrália	FJ888529	<i>G. platensis</i>
H11 (1)	Austrália	FJ888531	<i>G. pulverulentus</i>
H12 (1)	Austrália	FJ888532	<i>G. pulverulentus</i>
H13 (1)	Austrália	FJ888533	<i>G. pulverulentus</i>
H14 (1)	Austrália	JN391486	<i>G. scutellatus</i>
H15 (1)	Austrália	FJ888534	<i>Gonipterus sp. n.1</i>
H16 (1)	Austrália	FJ888535	<i>Gonipterus sp. n.1</i>
H17 (1)	Austrália	FJ888536	<i>Gonipterus sp. n.1</i>
H18 (1)	Austrália	FJ888537	<i>Gonipterus sp. n.1</i>
H19 (1)	Austrália	FJ888538	<i>Gonipterus sp. n.1</i>
H20 (1)	Austrália	FJ888539	<i>Gonipterus sp. n.2</i>
H21 (1)	Austrália	FJ888541	<i>Gonipterus sp. n.2</i>
H22 (1)	Austrália	FJ888542	<i>Gonipterus sp. n.2</i>
H23 (1)	Austrália	FJ888544	<i>Gonipterus sp. n.2</i>
H24 (1)	Austrália	FJ888545	<i>Gonipterus sp. n.2</i>
H25 (1)	Austrália	FJ888547	<i>Gonipterus sp. n.2</i>
H26 (1)	Austrália	FJ888553	<i>Gonipterus sp. n.2</i>
H27 (1)	África do Sul	JN391484	<i>Gonipterus sp. n.2</i>

**Tabela A.2.** Haplótipo, país, código de acesso do GenBank e espécie das sequências dos fragmentos do gene COI utilizadas para a construção da árvore filogenética para as espécies do complexo *Gonipterus scutellatus* (continuação)

Haplótipo (n)	País	Código de acesso GenBank	Espécie
H26 (1)	Austrália	FJ888553	<i>Gonipterus sp. n.2</i>
H27 (1)	África do Sul	JN391484	<i>Gonipterus sp. n.2</i>
H28 (1)	Austrália	FJ888557	<i>Gonipterus sp. n.3</i>
H29 (1)	Austrália	FJ888558	<i>Gonipterus sp. n.3</i>
H30 (1)	Austrália	FJ888559	<i>Gonipterus sp. n.3</i>
H31 (1)	Austrália	FJ888560	<i>Gonipterus sp. n.3</i>
H32 (1)	Austrália	FJ888567	<i>G. balteatus</i>
H33 (1)	Austrália	FJ888568	<i>Gonipterus sp. n.4</i>
H34 (1)	Austrália	FJ888569	<i>Gonipterus sp. n.4</i>