

Distanciamento Genético de uma População de Processionária do Pinheiro *Thaumetopoea pityocampa*, com Ciclo Biológico Distinto

Santos, H. M.¹; Kerdelhué, C.²; Rousselet, J.³; Paiva, M. R.⁴; Branco, M. R.¹

(1) Instituto Superior de Agronomia, 1349-017 Lisboa.

(2) Institut National de la Recherche Agronomique, Bordeaux. E

(3) Institut National de la Recherche Agronomique, Orleans.

(4) DCEA, Faculdade de Ciências e Tecnologia, UNL, 2829-516 Campus de Caparica.

INTRODUÇÃO

A processionária do pinheiro *Thaumetopoea pityocampa* (Den. & Schiff.) (Lepidoptera, Thaumetopoeidae) é uma espécie desfolhadora que ocorre em toda a bacia do Mediterrâneo, causando prejuízos graves em pinhais e problemas de saúde pública nas zonas urbanas, devido à presença de pêlos urticantes nas larvas dos últimos instares (Ferreira & Ferreira, 1990). Em Portugal apenas está descrita esta espécie do género *Thaumetopoea* [Hübner, (1820)], associado a *Pinus* spp. Porém, na Europa e bacia do Mediterrâneo, são conhecidas outras espécies, associadas não só a pinheiros, como a outros géneros de árvores, e.g. *Quercus* spp. (Douma-Petridou, 1989; Schmidt, 1989). No ano de 1997 foi detectada, em Portugal, uma população de *T. pityocampa* em pleno desenvolvimento larvar no Verão, ao invés de no Inverno, como seria normal (Paiva, observação pessoal; Way et al., 1999). Os indivíduos desta população são morfologicamente muito semelhantes aos da espécie *T. pityocampa*. Não obstante, poderia tratar-se de uma nova espécie, ou de uma população diferenciada, que tivesse eventualmente sofrido uma alteração do seu ciclo, por razões desconhecidas.

O principal objectivo deste estudo consistiu em testar se as duas populações, de Inverno e de Verão, pertencem, ou não, à mesma espécie. Efetuou-se um estudo genético, para aferir as diferenças existentes entre esta população, e outras populações, quer portuguesas quer estrangeiras de *T. pityocampa*, e outras espécies do género *Thaumetopoea*. Foi assim possível posicioná-las, em termos de distanciamento genético, relativamente às restantes populações estudadas. O trabalho laboratorial foi realizado na Station de Zoologie Forestière - Institut National de la Recherche Agronomique, Orléans, França.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se a sequenciação de duas regiões diferentes do ADN, com o objectivo de verificar se a população de Verão pertence, ou não, à espécie *T. pityocampa*. Escolheu-se uma região codificante situada no ADN mitocondrial, a citocromo oxidase 1 (CO1) (Caterino et al., 2000), que é apropriada para a avaliação de diferenças ao nível da espécie (Harrison, 1989), e como reforço um marcador nuclear, não codificante, ITS1 (internal transcribed spacer) (Shivji, 2004).

Para estudar a diferenciação desta população anómala, em relação a outras populações da mesma espécie, utilizaram-se microsatélites, marcadores polimórficos situados no ADN nuclear, onde se espera grande variabilidade, pelo que são marcadores adequados para estudos inter-populacionais (Jarne & Lagoda, 1996; Queller et al., 1993). Os microsatélites utilizados consistiram em cinco loci, desenvolvidos para a processionária do pinheiro por Rousselet (Rousselet et al., 2004).

AMOSTRAGEM

A amostragem consistiu na recolha de cerca de 10 larvas de 1º e 2º instares, colhidas de cerca de 30 ninhos, em seis locais de Portugal Continental: Viseu, Bragança, Vila Real, Alcácer (populações cujo desenvolvimento larvar ocorre durante o Inverno) e Leiria (populações de Verão e de Inverno). Amostraram-se ainda indivíduos adultos de uma população localizada na Península de Setúbal, Apostiça. Foram também utilizadas amostras, disponibilizadas pelo Laboratório de Zoologia Florestal do INRA em Orléans, de uma população francesa, Pierroton, três de Espanha, Guaderrama, Granada e Boltaña, bem como sequências já conhecidas de outras regiões, para as espécies *Thaumetopoea wilkinsoni*, *Thaumetopoea pinivora* e *Thaumetopoea solitaria*.

Foi extraído o ADN de um indivíduo, de cada uma das amostras, segundo o protocolo de extracção da Sigma (GenElute Mammalian Genomic DNA), sendo depois processado de acordo com o marcador a utilizar.

SEQUENCIAÇÃO DE CO1 E DE ITS1

Depois de extraído, o ADN foi amplificado por PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando pares de primers específicos para cada região a amplificar. No caso de CO1, utilizaram-se 30 ciclos, consistindo em desnaturação a 94°C, 2 minutos, ligação a 48°C, 1 minuto, extensão a 72°C, 90 segundos. Para ITS1 a PCR consistiu em 30 ciclos de desnaturação a 94°C, 1 minuto, ligação a 50°C, 1 minuto, extensão a 72°C, 1 minuto.

Depois de amplificado, o ADN passou por várias fases de purificação e electroforese em gel de agarose a 1% a 100 Volt até ser sequenciado.

As reacções de sequenciação utilizadas foram iguais para CO1 e ITS1, e consistiram em 25 ciclos de desnaturação a 96°C, 10 segundos, ligação a 50°C, 15 segundos, extensão a 60°C, 4 minutos.

Obtidas as sequências da zona alvo, observam-se mutações, bases diferentes em determinado local. Diferentes tipos de mutações podem ser ponderados de acordo com vários modelos matemáticos, para calcular medidas de distanciamento genético, que permitem construir árvores filogenéticas das várias amostras (Nei & Kumar, 2000). Neste trabalho utilizou-se o método Neighbour-Joining, baseado no princípio da evolução mínima, com a opção de apagar as bases na sequência com incertezas ou ausência de informação, utilizando os softwares Bioedit (Hall, 1999) e MEGA 2.1 (Kumar, 2001) e PAUP 4 (Swofford, 2000).

MICROSATÉLITES

No caso dos microsatélites, foram analisados 5 loci distintos, utilizando os primers descritos em Rousset et al. (2004). Como havia que amplificar 5 loci, foram preparadas, para cada amostra, 5 reacções de PCR diferentes, cada uma com as suas particularidades de temperaturas e primers.

Desnaturação inicial a 95°C, 3 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C, 50 segundos; ligação a 53°C (locus MSPP07 e MSPP40), 54°C (locus MSPP42 e MSPP53) ou 56°C (locus MSPP55), 1 minuto; extensão a 72°C, 30 segundos.

A análise dos resultados fornecidos pelo estudo dos microsatélites, foi feita com base nas percentagens de heterozigotia (Solignac et al., 1995), utilizando vários modelos e os softwares Genetix 4.05 (Belkhir K., 1996) e Arlequin 2.00 (Schneider et al., 2000). A heterozigotia é considerada como sendo o melhor indicador da variabilidade genética das populações. Conhecendo as frequências alélicas dos vários loci analisados, podem calcular-se vários índices de fixação, F_{ST} (que indica o grau de diferenciação entre populações), F_{IS} (que mede o

decréscimo da heterozigotia no seio de uma população) e F_{IT} (que mede o decréscimo de heterozigotia global entre o indivíduo e o conjunto das populações). Considerando as frequências alélicas dos vários loci analisados, é possível estudar as populações, de acordo com o modelo de Hardy-Weinberg (e.g. Ridley, 2004), um modelo matemático de inércia que considera uma população ideal, submetida a um conjunto de pressupostos teóricos, e em relação à qual se podem comparar as populações naturais, com a ajuda dos índices de fixação (Ridley, 2004; Solignac et al., 1995).

RESULTADOS

SEQUENCIAÇÃO DE CO1 E ITS1

Na Tabela 1 encontram-se as distâncias genéticas obtidas com a utilização do parâmetro Kimura-2, com opção de deleção completa.

Tabela 1 - Género *Thaumetopoea* (Insecta:Lepidoptera): distâncias genéticas entre populações de *T. pityocampa* e entre espécies diferentes, obtidas utilizando o marcador citocromo oxidase 1 (CO1), calculadas em percentagem.

	Leiria Ver.	Leiria Inv.	Apostiça	Alcacer	Viseu	Varges	Sevivas	Guadarrama	Pierroton	<i>T. wilkinsoni</i>	<i>T. pinivora</i>
Leiria Verão	0,00%										
Apostiça	0,00%	0,00%									
Alcacer	0,00%	0,00%	0,00%								
Viseu	0,10%	0,00%	0,00%	0,00%							
Varges	0,20%	0,20%	0,20%	0,20%	0,20%						
Sevivas	0,20%	0,20%	0,20%	0,20%	0,20%	0,10%					
Guadarrama	0,20%	0,20%	0,20%	0,20%	0,20%	0,30%	0,30%				
Pierroton	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	0,90%	1,10%	1,00%	1,10%			
<i>T. wilkinsoni</i>	8,50%	8,40%	8,40%	8,40%	8,50%	8,60%	8,60%	8,30%	8,60%		
<i>T. pinivora</i>	12,50%	12,50%	12,50%	12,50%	12,50%	12,70%	12,60%	12,30%	12,00%	14,00%	
<i>T. solitaria</i>	14,60%	14,60%	14,60%	14,60%	14,60%	14,80%	14,70%	14,60%	14,30%	15,20%	13,50%

Podemos observar que não existem diferenças entre as populações de Verão, e de Inverno de Leiria, e que estas populações apresentam diferenças, respectivamente de 0,3% e 0,9-1,1%, em relação às populações espanholas e francesas de *T. pityocampa*. Pequenas diferenças entre as várias populações portuguesas, do Norte e Centro-Sul, indicam que o marcador apresenta sensibilidade para distinguir populações relativamente próximas. A distância genética aumentou quando comparamos as várias populações de *T. pityocampa*, com outras espécies, nomeadamente *T. wilkinsoni*, *T. pinivora* e *T. solitaria*, sendo *T. wilkinsoni* a mais próxima (8,4 a 8,6%) e *T. solitaria* a mais afastada (13,5 a 15,2%).

A árvore filogenética construída com estas distâncias (Figura 1), evidencia estes resultados, estando as populações portuguesas reunidas num mesmo grupo, e separadas das populações francesas, bem assim daquelas das outras espécies.

Os resultados obtidos com o marcador nuclear sequenciado (ITS1) corroboram estes resultados, sendo que não se registaram diferenças, a nível específico, entre quaisquer das populações portuguesas.

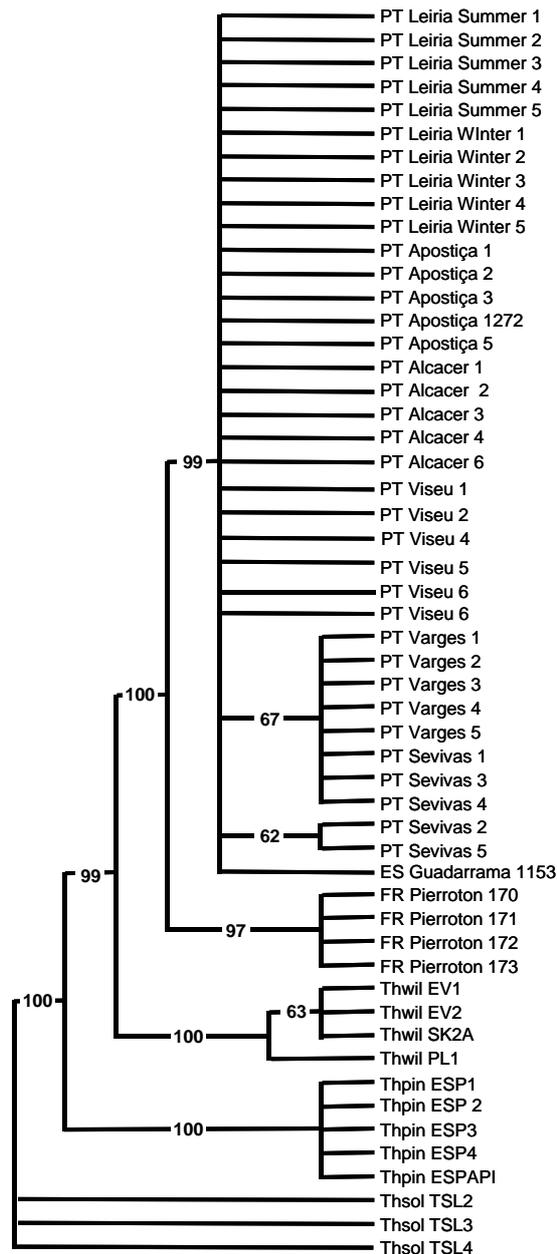


Figura 1 - Árvore filogenética para o género *Thaumetopoea* (Insecta:Lepidoptera), construída utilizando o marcador genético citocromo oxidase 1 (CO1).

MICROSATÉLITES

A Tabela 2 indica a variabilidade alélica encontrada para os microsátélites utilizados. Podemos observar que existem, em média, menos alelos para as populações portuguesas, em particular para a população de Verão, com exceção do locus 2, onde se verifica um resultado inesperado. As populações de Viseu, Espanha e França são as que apresentam, em média, maior riqueza de alelos.

As distâncias entre populações, dadas pelo índice F_{st} (Tabela 3), mostram que a população de Verão se encontra mais afastada da população de Inverno de Leiria, do que por exemplo da população francesa de Pierroton, que se situa geograficamente muito longe. A população de Inverno de Leiria encontra-se menos distanciada geneticamente de qualquer das populações portuguesas, do que da população simpátrica de Verão.

Tabela 2 - Género *Thaumetopoea* (Insecta:Lepidoptera): variabilidade alélica para os 5 loci para as populações de *T. pityocampa*, obtidas utilizandomicrosatélites

População	No. indiv.	Nº Alelos					Nº médio de alelos	Heterozigotia média	
		Locus 1	Locus 2	Locus 3	Locus 4	Locus 5		H exp.	H obs.
Leiria Verão	29	2	13	3	4	2	4,8	52%	52%
Leiria Inverno	15	2	4	6	4	3	3,8	55%	49%
Apostiça	24	2	3	5	4	3	3,4	47%	45%
Alcacer	31	4	8	9	4	5	6,0	71%	65%
Viseu	24	7	11	9	12	5	8,8	73%	73%
Guaderamma	24	7	14	7	8	4	8,0	68%	68%
Boltana	21	7	9	9	13	5	8,6	75%	78%
Granada	20	7	7	11	9	4	7,6	77%	80%
Pierroton	28	4	12	11	12	6	9,0	69%	69%
Total		13	22	18	19	10			

Tabela 3 - Género *Thaumetopoea* (Insecta:Lepidoptera): Afastamento das populações, dado pelo índice de fixação, Fst, obtido com os dados de microsatélites.

	Boltaña	Viseu	Granada	Apostica	Leiria Ver.	Leiria Inv.	Alcacer	Pierroton
Guaderama	11,5%	4,8%	10,1%	20,7%	16,4%	18,9%	3,7%	6,9%
Boltaña		12,8%	6,6%	27,7%	27,0%	23,3%	12,0%	9,7%
Viseu			7,5%	9,6%	14,2%	6,6%	2,2%	10,5%
Granada				19,4%	25,0%	13,9%	9,0%	11,3%
Apostica					25,0%	3,7%	14,7%	28,8%
Leiria Verão						23,5%	13,3%	20,6%
Leiria Inverno							11,6%	23,6%
Alcacer								10,4%

Podemos ainda observar que existe uma baixa diversificação entre as populações de Alcácer, Guaderrama e Viseu, e também entre as populações de Inverno de Leiria, e as de Viseu e Guaderrama .

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para o estudo do CO1, indicam claramente que a população de Verão de Leiria pertence à mesma espécie das restantes populações estudadas, isto é *T. pityocampa*. Não se verifica qualquer diferenciação a nível específico, conclusão esta que é reforçada pelos resultados do marcador nuclear sequenciado, ITS1.

No entanto, os resultados fornecidos pelo estudo dos microsatélites indicam que esta população se encontra já bastante diferenciada da população de Inverno, sendo que, actualmente, o fluxo genético entre elas será muito limitado, ou mesmo nulo. O estudo dos microsatélites permitiu ainda inferir que estas populações se encontram diferenciadas, considerando uma escala temporal histórica, mas não uma escala geológica, uma vez que o ADN mitocondrial tem um alcance de inferência da ordem dos milhares, aos milhões de anos (Crandall et al., 2000). Adicionalmente, os mesmos resultados sugerem que a população de Verão terá sido fundada a partir da população simpátrica de Inverno.

Considerou-se, até cerca de meados do século XX, ser a especiação alopátrica, isto é a que ocorre por separação física das populações, o principal mecanismo de especiação. Sabe-se hoje, no entanto, que a especiação simpátrica é um processo bastante comum (Barraclough &

Nee, 2001; Berlocher & Feder, 2002; Coyne & Orr, 1998), podendo resultar da actuação de mecanismos de vários tipos, como por exemplo ecológicos, etológicos, ou outros. O seu desfecho final é a interrupção do fluxo genético, entre indivíduos, que originalmente pertenciam a uma mesma população.

A especiação simpátrica observa-se com frequência em insectos herbívoros (Via, 2001), embora geralmente por mudança de hospedeiro, o que não sucede no presente caso. Um estudo realizado em Leiria, em três anos consecutivos, mostrou que os períodos de vôo das populações de Verão e de Inverno de *T. pityocampa*, estiveram separados por intervalos compreendidos entre 33 a 43 dias (Pimentel, 2004), o que garante, para estes anos, o seu isolamento reprodutivo, porém não exclui a possibilidade de sobreposição parcial, em anos com condições climáticas excepcionais.

O desenvolvimento larvar estival de *T. pityocampa* está sujeito a várias condicionantes. De acordo com (Demolin, 1969), o limite letal superior para o estado de larva, situa-se nos 32°C, e o limiar do desenvolvimento nos 30°C. Tais temperaturas são facilmente atingidas no Verão, em Portugal, na maior parte das zonas de distribuição da espécie. Porém, na região onde se localiza a Mata Nacional de Leiria, estas raramente excedem os 25°C, o que permite o desenvolvimento larvar durante os meses de Verão.

O aparecimento da população de Verão coloca questões complexas em termos de gestão florestal. Por um lado, as árvores passam a estar sujeitas a duas desfolhas anuais, com implicações obviamente mais gravosas para o seu crescimento do que quando ocorre apenas uma (Moura, 2002). Por outro lado, o surgimento desta população anómala, determina a necessidade de aplicação de medidas de prevenção e controlo em duas épocas do ano diferentes, o que implica alterações no delineamento das estratégias de combate e custos acrescidos. Assim, no caso da aplicação de bioinsecticidas, como *Bacillus thuringiensis*, ou de outros químicos, como Diflubenzurão ou Tebufenozida, estes terão que ser aplicados duas vezes por ano, acarretando tanto consequências económicas, como ambientais, mais gravosas, uma vez que estes químicos actuam sobre toda a entomofauna, em particular sobre a ordem (Lepidoptera) e têm também impactes a nível do ecossistema.

Serão necessários mais estudos para identificar as causas que originaram o aparecimento desta população de ciclo distinto. Dado o valor científico de um caso com esta raridade, que permite o acompanhamento de um eventual processo de especiação, será da maior importância continuar os estudos fenológicos, ecológicos, morfológicos e genéticos destas populações da processionária do pinheiro. Concomitantemente, considerando as graves implicações para a protecção florestal que esta nova população origina, será indispensável seguir atentamente a sua dinâmica populacional e adoptar, atempadamente, medidas efectivas de gestão.

REFERÊNCIAS:

- Barraclough, T.G. & Nee, S. (2001). Phylogenetics and speciation. *TRENDS in Ecology & Evolution.*, **16**, 391-399.
- Belkhir K., B.P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. (1996). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II: Montpellier.
- Berlocher, S.H. & Feder, J.L. (2002). Sympatric speciation in phytophagous insects: Moving beyond controversy? *Annual Review of Entomology*, **47**, 773-815.

- Caterino, M., Cho, S. & Sperling, F. (2000). The Current State of Insect Molecular Systematics: A Thriving Tower of Babel. *Ann. Rev. Entomol.*, **45**, 1-54.
- Coyne, J.A. & Orr, H.A. (1998). The evolutionary genetics of speciation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **353**, 287-305.
- Crandall, K.A., Bininda-Emonds, O., Mace, G.M. & Wayne, R.K. (2000). Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, **15**, 290-295.
- Demolin, G. (1969). Bioecologia de la Procecionaria del pino *Thaumetopoea pityocampa* Schiff. Incidencia de los factores climaticos. *Boletin del Servicio de Plagas Forestales*, **12**, 9-24.
- Douma-Petridou, E. (1989). European *Thaumetopoea* species (Lep., Thaumetopoeidae): characteristics and life-cycles. In *Proc. Thaumetopoea-Symp.* pp. 12-19: Neustadt / Rbge.
- Ferreira, M.C. & Ferreira, G.W.S. (1990). *Pragas das resinosas. Guia de campo*. Série Divulgação: Lisboa.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. Program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, **41**, 95-98.
- Harrison, R.G. (1989). Animal Mitochondrial DNA as a Genetic Marker in Population and Evolutionary Biology. *Trends Ecol. Evol.*, **4**, 6-11.
- Jarne, P.J. & Lagoda, P.J.L. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.*, **11**, 424-429.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B., Nei M. (2001). MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics*, **12**, 1244-1245.
- Moura, E. (2002). *Interacções Produtividade/Fitófagos para o Ecosistema Pinhal*. Universidade Nova de Lisboa. Faculdade de Ciências e Tecnologia: Lisboa.
- Nei, M. & Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press.: New York.
- Pimentel, C.S.M.G. (2004). Pine Processionary Moth (*Thaumetopoea pityocampa*) and Great Tit (*Parus major*) in Portugal: Population dynamics and interactions. Universidade Nova de Lisboa. Faculdade de Ciências e Tecnologia: Lisboa.
- Queller, D.C., Strassman, J.E. & Hughes, C.R. (1993). Microsatellites and kinship. *Trends Ecol. Evol.*, **8**, 285-288.
- Ridley, M. (2004). *Evolution*. Blackwell.
- Rousselet, J., Magnoux, E. & Kerdelhue, C. (2004). Characterization of five microsatellite loci in the pine processionary moth *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera Notodontidae Thaumetopoeinae). *Molecular Ecology Notes*, **4**, 213-214.
- Schmidt, G.H. (1989). Life cycles of *Thaumetopoea* species distributed in different regions of Europe, North Africa and near east. In *Proc. Thaumetopoea-Symp.* pp. 20-34: Neustadt/Rbge.
- Schneider, S., Roessli, D. & Excoffier, L. (2000). Arlequin: A software for population genetics data analysis. Version 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva: Geneva.

- Shivji, M. (2004). Internal Transcribed Spacer Regions,.
- Solignac, M., Periquet, G., Anxolabehere, D. & Petit, C. (1995). *Génétique et Evolution. I. La variation, les gènes dans les populations*. Vol. 1. Hermann: Paris.
- Swofford, D.L. (2000). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates: Sunderland, Massachuttets.
- Via, S. (2001). Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *TRENDS in Ecology & Evolution*, **16**, 330-343.
- Way, M.J., Cammell, M.E. & Paiva, M.R. (1999). Natural biological control of the pine processionary moth *Thaumetopoea pityocampa* by the argentine ant *Linepithema humile* in Portugal (Port.). *Agric. and Forest Entomol.*, **1**, 27-31.
- Way, M. J., Cammell ME, Paiva MR (1999) Natural biological control of the pine processionary moth *Thaumetopoea pityocampa* by the argentine ant *Linepithema humile* in Portugal (Port.). *Agric. and Forest Entomol.* 1: 27-31.