

## VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *SITOPHILUS ZEAMAI* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) DETECTADA ATRAVÉS DE MARCADORES ISSR

Alexia Marques Fernandes dos Santos (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Claudete Aparecida Mangolim (Coorientadora), Liriana B. Cantagalli (Coorientadora)  
Ana Silvia Lapenta (Orientador), e-mail: aslapenta@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

### Área Genética/ subárea Genética Animal

**Palavras-chave:** marcadores moleculares, polimorfismo, PCR

### Resumo

A espécie *Sitophilus zeamais* é uma importante praga de grãos armazenados, pois o ataque por esses insetos levam a depreciação do produto, responsáveis por grande prejuízo econômico. O desenvolvimento deste trabalho teve por objetivo detectar e estimar o grau de polimorfismo por meio de marcadores ISSR dentro e entre as populações de *Sitophilus zeamais*. A porcentagem de loci polimórfico variou de 71,18 a 87,06%, a diversidade genética estimada pelo índice de Shannon variou entre 0,34 a 0,43, os valores da distância genética de Nei variaram de 0,08 a 0,22. O conhecimento da estrutura genética das populações da espécie estudada poderá auxiliar no desenvolvimento de práticas de medidas de controle mais eficientes.

### Introdução

Um dos principais problemas relacionados a depreciação de grãos armazenados são os ataques por insetos, com destaque para gorugulho do arroz e do milho, *Sitophilus oryzae* e *Sitophilus zeamais*, respectivamente (DROSDOSKI, 2015). A variabilidade genética é fator importante pois permite a adaptação da espécie frente a mudanças ambientais, inclusive a presença de inseticidas. Muitas pesquisas sobre variabilidade genética são baseadas em marcadores moleculares e estes tem possibilitado o entendimento da estrutura populacional destas espécies. Coelho-Bortolo et al. (2015) estudaram a variabilidade genética de populações da praga *Lasioderma serricorne* utilizando os marcadores RAPD e isoenzimas. O estudo mostrou que as populações analisadas possuíam um alto grau de variabilidade genética associada ao tamanho das populações. O ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), é um marcador bastante utilizados para este fim, por meio da análise deste marcador são gerados fragmentos de DNA de 100 a 3000 pb, amplificados via PCR usando somente um *primer* com 16 a

20 pb, desenhado a partir de sequências de microssatélites, amplificando a região inter-SSR (ZIETKIEWICZ et. al., 1994). O objetivo desse trabalho foi detectar e estimar o grau de polimorfismo por meio de marcadores ISSR dentro e entre as populações de *Sitophilus zeamais*.

## Materiais e métodos

### Obtenção do Material Biológico

Foram utilizadas quatro populações de estabelecimentos comerciais das cidades de Maringá e Toledo do estado do Paraná. As quatro populações foram classificadas em *Sitophilus zeamais*, segundo a classificação de Athié e Paula (2002).

### Amplificação dos marcadores ISSR

Foram utilizados para esse estudo 12 marcadores ISSR. As amostras de DNA de 60 indivíduos foram obtidas em projeto anterior. A PCR foi realizada no termociclador Techne TC-512. Os reagentes empregados para cada reação foram tampão de reação 1X (10 mM de Tris-HCl, pH 8,8), 2,0 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de cada dNTP, 1U de *Taq-DNA Polimerase Platinum* (Invitrogen) a concentração de DNA específica para cada amostra, o *primer* específico e água mili-Q para um volume final de 20 µL de solução. A temperatura de anelamento foi padronizada em estudo anterior e variaram de 48 °C até 50°C. Aos produtos da amplificação foram adicionados 2 µL de tampão *Loading* (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30%) e estes separados em gel de agarose com concentração definida, usando tampão TBE 0,5X (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico e 1 mM EDTA). Os géis foram expostos a um campo elétrico de 60 Volts, por aproximadamente quatro horas e após este período foram corados em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL. A imagem foi capturada em transluminador L-PIX HE, Loccus biotecnologia.

### Análise de dados

A análise de dados foi feita seguindo a metodologia utilizada em Coelho-Bortolo et al. 2015. Os segmentos de DNA do ISSR foram analisados pela comparação do perfil de cada inseto em termos de presença (1) ou ausência (2) de cada fragmento de DNA amplificado. Baseado nessa análise, foi construída uma matriz binária para estimar a porcentagem de *loci* polimórficos (P) e o grau de diferenciação genética entre as populações (Gst). As distâncias genéticas de Nei (1978) calculadas permitiram a construção de um dendograma utilizando o método UPGMA, *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*. Todas as análises foram feitas, utilizando o software POPGENE.

## Resultados e Discussão

Os 12 primers usados neste estudo produziram 170 fragmentos nítidos e reproduzíveis, apenas dois monomórficos. Cada primer produziu uma média de 14 fragmentos (figura 1). A porcentagem de locos polimórficos variou de 71,18%, na população 1 e 4, de Maringá e Toledo, respectivamente, a 87,06% , na população 2, de Maringá. A diversidade genética estimada pelo índice de Shannon (I) variou entre 0,34 na população 4, de Toledo, a 0,43 na população 2, de Maringá. Os valores da distância genética de Nei (1978) variaram de 0,08 a 0,22 (figura 2). O dendograma (figura 3) baseado nestas distâncias mostra as quatro populações divididas em dois grupos : o grupo A, formado pelas populações 1, 3 e 4, pertencentes às cidades de Maringá (pop 1 e 3) e Toledo (pop 4), localizadas no Paraná; o grupo B, formado pela população 2, referente a cidade Maringá. A espécie *Sitophilus zeamais* é de grande interesse econômico pois é considerada uma praga para no processo de armazenagem de grãos, entretanto existem poucos estudos sobre a diversidade genética das populações desta espécie. Este é o primeiro estudo realizado no Brasil sobre a diversidade genética de populações naturais de *Sitophilus zeamais* utilizando o marcador ISSR. Este marcador revelou um alto nível de polimorfismo nas populações analisadas, explicando em parte a grande capacidade de adaptação desta espécie.

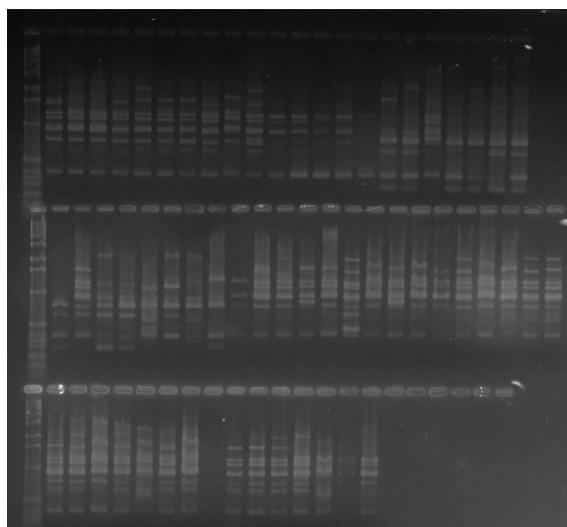


Figura 1 – Padrão de amplificação do primer 17898A em gel de agarose 1,7%.

pop ID	1	2	3	4
1	****	0.8015	0.8918	0.8983
2	0.2213	****	0.8271	0.7906
3	0.1145	0.1899	****	0.9266
4	0.1072	0.2350	0.0762	****

Figura 2- Matriz de similaridade

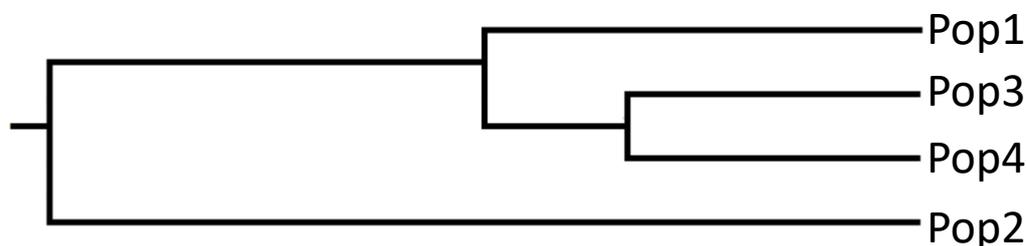


Figura 3- Dendrograma baseado nas distâncias genética de Nei (1978)

## Conclusões

O conhecimento da estrutura genética de populações de *Sitophilus zeamais* é um passo importante, que poderá contribuir para o emprego de estratégias de controle mais adequadas. Entretanto, são necessários mais estudos sobre a origem e o tempo de infestação, bem como o padrão de dispersão desta praga. Assim, o conjunto destas informações auxiliará no desenvolvimento de práticas de medidas de controle mais eficientes.

## Agradecimentos

A Fundação Araucária pela concessão da bolsa de estudos e a todas as pessoas que auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

## Referências

COELHO-BORTOLO, T.; MANGOLIN, C.A.; LAPENTA, A.S. Genetic variability in the natural populations of *Lasioderma serricorne* (F.) (Coleoptera: Anobiidae), detected by RAPD markers and by esterase isozymes. **Bulletin of Entomological Research**. p.1-7, 2015

DROSDOSKI, S. D. **Identificação e caracterização de esterases e análise da resistência à inseticidas em *Sitophilus zeamais* e *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae)**. 36 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2015.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, 20:176-183, 1994.