

MÁRCIA RODRIGUES CARVALHO

**FILOGEOGRAFIA MOLECULAR E  
ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS DO CARUNCHO-DO-FEIJÃO  
*Acanthoscelides obtectus* (BRUCHIDAE:COLEOPTERA)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008

MÁRCIA RODRIGUES CARVALHO

**FILOGEOGRAFIA MOLECULAR E  
ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS DO CARUNCHO-DO-FEIJÃO  
*Acanthoscelides obtectus* (BRUCHIDAE:COLEOPTERA)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 25 de novembro de 2008.

---

Prof. Raul N. Carvalho Guedes  
(Co-Orientador)

---

Prof. Jorge A. Dergam dos Santos

---

Pesq. Eveline Teixeira Caixeta

---

Prof.<sup>a</sup> Márcia Rogéria de A. Lamego

---

Prof.<sup>a</sup> Maria Goreti de Almeida Oliveira  
(Presidente da Banca)

À minha família.  
Especialmente aos meus filhos Júlia e Lucas,  
pelo amor que me fez superar todas as dificuldades.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me dado forças para conseguir caminhar nesta jornada e superar as inúmeras dificuldades

Aos meus pais Ed e Lia e meus irmãos Gustavo e Poliana pelo apoio constante, especialmente ao meu pai pelo companheirismo fundamental.

Ao meu marido André por sempre me incentivar, apoiar de maneira incondicional e acreditar na minha capacidade de vencer esta difícil etapa.

À Universidade Federal de Viçosa, e ao curso de pós-graduação em Bioquímica e biologia molecular por permitido a execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão à bolsa de estudos.

Ao Professor Luiz Orlando pelos ensinamentos, orientação e compreensão.

Ao Professor Raul Narciso pelas sugestões e grande participação no trabalho.

Aos produtores rurais, pesquisadores, professores e colegas que gentilmente enviaram sementes de feijão infestadas com carunchos para a realização deste trabalho. Especialmente aos pesquisadores Irajá F. Antunes (Embrapa Clima Temperado), Maria Celeste Vidigal (UEM), Ângela Abreu (UFLA) e ao colega Alexandre pela constante disponibilidade de envios de amostras.

Aos colegas de laboratório, Ana, Giselle, Maria Andréia, Bia, Cassiana, Maíra, Lílian, Magali, Roberta, Zeinnep, Larissa, Pricila, Mariana, Talles, Celice, Bruna, Michelia, Luíz, Fernanda, Pollyana e Andréia por sempre me auxiliarem de forma direta ou indireta, pela troca de experiências e pela convivência.

À Flávia e Luciana Barbosa pela participação constante e fundamental neste trabalho.

À amiga Giselle pelo companheirismo, ensinamentos, dedicação, cumplicidade e amizade, além da ajuda para realização deste trabalho.

À Fernanda Santana e Ranielle pela disposição em ajudar sempre.

Aos funcionários do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela convivência.

A professora Elza por me ensinar a ver a pesquisa com olhos de uma verdadeira cientista.

Ao Eduardo, secretário da pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, pelo companheirismo e por sempre de forma gentil e competente atender às minhas inúmeras solicitações.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta participaram da realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA

MÁRCIA RODRIGUES CARVALHO, filha de Ed Geraldo Rezende Carvalho e Lia Lourdes Rodrigues Carvalho, nasceu na cidade de Viçosa, Minas Gerais, em 09 de fevereiro de 1972.

Em dezembro de 1990 concluiu o ensino médio no Colégio Equipe, em Viçosa-MG.

No ano de 1993 iniciou o curso de graduação em Nutrição, pela Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em dezembro de 1997.

Em fevereiro de 1998, iniciou o curso de pós-graduação em Bioquímica Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se aos exames finais de defesa de dissertação para obtenção do título de *Magister Scientiae*, em 15 de fevereiro de 2001.

Em agosto de 2004, ingressou no curso de doutorado em Bioquímica Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se aos exames finais de defesa de tese para obtenção do título de *Doctor Scientiae*, em Bioquímica Agrícola no dia 25 de novembro de 2008.

## SUMÁRIO

Página

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
INTRODUÇÃO GERAL .....	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	03

---

### **CAPÍTULO I: DIVERSIDADE MOLECULAR E HISTÓRIA EVOLUTIVA DO CARUNCHO- DO- FEIJÃO *Acanthoscelides obtectus***

---

RESUMO .....	04
ABSTRACT .....	05
INTRODUÇÃO .....	07
METODOLOGIA .....	10
Amostragem das populações .....	10
Extração de DNA, amplificação e sequenciamento .....	11
Análise das seqüências e estimação da rede de haplótipo .....	15
RESULTADOS .....	16
Gene COI .....	16
Gene rRNA16S .....	18
Estrutura genealógica e geográfica .....	19
Rede de haplótipos e distribuição geográfica .....	22
DISCUSSÃO .....	28
Linhagens distintas nos centros de origem .....	29
Origem das linhagens do caruncho no Brasil .....	30
Estrutura filogeográfica do caruncho no Brasil .....	30
CONCLUSÕES .....	34
REFERÊNCIAS .....	36

---

### **CAPÍTULO II: ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO PROTEICO E DE CARBOIDRATOS EM POPULAÇÕES DO CARUNCHO-DO-FEIJÃO (*Acanthoscelides obtectus*)**

---

RESUMO .....	40
--------------	----

ABSTRACT.....	41
INTRODUÇÃO.....	42
MATERIAL E MÉTODOS.....	45
Populações de <i>Acanthoscelides obtectus</i> .....	46
Obtenção dos extratos enzimáticos.....	47
Determinação da concentração de proteínas.....	47
Determinação da concentração de proteínas.....	47
Análise estatística.....	48
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
CONCLUSÕES.....	53
AGRADECIMENTOS.....	53
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXOS.....	58

---

## RESUMO

CARVALHO, Márcia Rodrigues, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2008. **Filogeografia molecular e atividade de enzimas digestivas do caruncho-do-feijão, *Acanthoscelides obtectus* (Bruchidae:Coleoptera)**. Orientador: Luiz Orlando de Oliveira. Co-orientadores: Maria Goreti de Almeida Oliveira e Raul Narciso Carvalho Guedes

No cenário mundial, o Brasil destaca-se como grande produtor e consumidor mundial do feijão comum, *Phaseolus vulgaris*, entretanto apresenta baixa produtividade devido a alguns fatores dentre eles, baixo nível tecnológico empregado no cultivo e a falta de cuidados fitossanitários principalmente durante o armazenamento dos grãos. Grandes perdas no armazenamento de feijão (*P. vulgaris*) são atribuídas aos carunchos de grãos leguminosos causando a diminuição do seu valor nutricional. As principais enzimas relacionadas ao metabolismo protéico e energético dos bruquídeos são as serino e cisteíno proteases e a  $\alpha$ -amilase. Os níveis diferenciados de atividades destas enzimas digestivas sugeriram uma maior eficiência metabólica. Portanto, o processo de resistência pode ser atribuído a uma melhor adaptação aos inibidores naturais presentes na planta levando ao sucesso reprodutivo e à perpetuação da espécie. No intuito de conhecer a diversidade genética e algumas características enzimáticas de populações do *Acanthoscelides obtectus*, foram realizados estudo filogeográfico e das enzimas do metabolismo protéico e energético deste inseto. O estudo filogeográfico foi baseado em dois genes do DNA mitocondrial, COI e rRNA16S, os quais permitiram inferir que os haplótipos oriundos das populações mexicanas e peruanas formaram duas linhagens independentes, ambas com alta diversidade genética. Nas populações brasileiras foram identificadas duas linhagens mitocondriais distintas, ambas com baixa

diversidade genética e, possivelmente, originadas da linhagem mesoamericana. Provavelmente estas linhagens chegaram ao Brasil apenas uma única vez formando duas linhagens ancestrais ou alternativamente, existiram dois eventos distintos de introdução a partir de uma mesma fonte. Uma das linhagens está geograficamente restrita à região sul e a outra está distribuída por todo o Brasil. A análise da atividade proteolítica de cisteíno e serino-proteases e atividade amidolítica do caruncho revelou que entre as quatro populações estudadas (Sobradinho, Viçosa, Cacoal e Bom Jesus do Amparo), a Sobradinho apresentou maior atividade de serino e cisteíno-proteases quando comparada às demais populações. Provavelmente, Sobradinho apresenta metabolismo mais eficiente frente aos inibidores de proteases presentes nas sementes de feijão. A população Viçosa apresentou maior atividade de amilase seguida por Bom Jesus do Amparo, enquanto que Cacoal e Sobradinho apresentaram menor atividade de amilase, não diferindo estatisticamente entre si.

## ABSTRACT

CARVALHO, Márcia Rodrigues, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2008. **Phylogeography and molecular activity of digestive enzymes of bean-weevil, *Acanthoscelides obtectus* (Bruchidae:Coleoptera)**. Adviser: Luiz Orlando de Oliveira. Co-Advisers: Maria Goreti de Almeida Oliveira and Raul Narciso Carvalho Guedes.

In the world, Brazil stands out as a major producer and consumer in the world of common bean, *Phaseolus vulgaris*, however has low productivity due to several factors among them, low technological level used in the cultivation and lack of care mainly plant grain during the storage of . Large losses in the storage of bean (*P. vulgaris*) are attributed to grain legumes weevil causing the decline of their nutritional value. The main enzymes related to energy and protein metabolism of bruchid are serine and cysteine proteases and  $\alpha$ -amylase. The different levels of activities of digestive enzymes suggested a higher metabolic efficiency. Therefore, the process of resistance may be attributed to better adaptation to the natural inhibitors present in the plant leading to reproductive success and perpetuation of the species. Here, we report a phylogeography study that investigated the genetic diversity and an enzyme study that examined the energy metabolism in of *Acanthoscelides obtectus*. The phylogeography study was based on two genes of mitochondrial genome, COI and rRNA16S, which revealed that populations from either Mexico or Peru consisted of one lineage each. Brazilian populations contained two distinct mitochondrial lineages, both with low genetic diversity, and possibly originated from the Mesoamerican lineage. Probably these lineages came to Brazil only once forming two ancestral lines. Alternatively, they were introduced repeatedly from the same parental source. One of the lines is geographically restricted to South Brazil,

whereas the other lineage is widespread all over Brazil. Comparative analysis of the proteolytic and amidolytic activity of cysteine and serine-protease between four study populations (Sobradinho, Viçosa, Cacoal, and Bom Jesus do Amparo) revealed Sobradinho with a higher activity of serine and cysteine proteases. Most likely, Sobradinho exhibited more efficient metabolism in relation to the protease inhibitors present in seeds. The population Viçosa showed higher activity of amylase followed by Bom Jesus do Amparo, while Cacoal and Sobradinho had lower activity of amylase and did not differ statistically.

## INTRODUÇÃO GERAL

Os vegetais são importantes fontes de nutrientes, sendo considerados alimentos de qualidade para a maioria dos organismos, incluindo os seres humanos, diferentes espécies de animais e invertebrados, particularmente os insetos. Nas últimas décadas, avanços têm sido realizados visando aumento da produtividade agrícola mundial. Esta preocupação é decorrente do aumento da população mundial aliado ao ataque de pragas e patógenos, sendo 13% das perdas causadas principalmente pelo ataque dos insetos fitófagos (Gatehouse *et al.*, 1992). Os pesticidas químicos têm sido utilizados, entretanto são prejudiciais, conduzindo à degradação do meio ambiente e eliminação de parasitóides e predadores naturais. Além do mais, centenas de insetos têm desenvolvido resistência a um ou mais inseticidas (Kaur, 2006).

Os carunchos (Bruquídeos) são insetos que se alimentam de sementes, mais especificamente de leguminosas. A maioria destes bruquídeos possuem distribuição mundial como resultado de longas movimentações comerciais de grãos, mediados por humanos a nível intra e inter-continentais. Esta dispersão tem sido artificialmente aumentada desde a domesticação do feijão *Phaseolus vulgaris* (Alvarez, *et al.*, 2005). A co-evolução inseto-planta reflete-se na evolução bioquímica, de ambas as espécies. No caso, as plantas hospedeiras produzem inseticidas naturais que podem intoxicar insetos fitófagos e estes desenvolvem mecanismos de destoxicação, sendo um processo dinâmico, sujeito as variações ao longo do tempo (Ridley, 2006, Mello & Silva-Filho, 2002).

O papel da mediação humana no processo migratório é de vital importância no entendimento da história biogeográfica do *Acanthoscelides obtectus*. O entendimento do padrão filogeográfico do caruncho é considerado de interesse agrônomo devido à variação de espécies nativas que podem apresentar dados das condições climáticas em que a espécie se originou, direcionando as pesquisas para agentes de controle biológico (Alvarez *et al.*, 2005). Assim, através dos estudos filogeográficos aliados aos dados enzimáticos dos carunchos de diferentes localidades, pode-se realizar pesquisas no intuito de selecionar aquelas populações candidatas para uso em controle biológico no Brasil.

## REFERÊNCIAS

- Alvarez, N., McKey, D., Hossaert-McKey M., Born, C., Mercier, L., Benrey, B. (2005). Ancient and recent evolutionary history of the bruchid beetle, *Acanthoscelides Obtectus* Say, a cosmopolitan pest of beans. **Molecular Ecology**, 14:1015-1024.
- Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A., Bolter, D. (1992). Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance. **Biotechnology in agriculture n°7: Plant Genetic Manipulation for crop protection**, CAB International. p. 155-181.
- Kaur, S. (2006). Molecular approaches for identification and construction of novel insecticidal genes for crop protection. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 22:233–253.
- Mello, M.O. & Silva-Filho, M. (2002). Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal Plant Physiology**, 14(2): 71-81.
- Ridley, M. (2006). **Evolução**. 3rd ed., Porto Alegre, Ed. Artmed. 752p.

## CAPÍTULO I

---

### DIVERSIDADE MOLECULAR E HISTÓRIA EVOLUTIVA DO CARUNCHO-DO-FEIJÃO (*Acanthoscelides obtectus*)

#### RESUMO

O caruncho *Acanthoscelides obtectus* é uma praga de grande impacto econômico que ataca grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) armazenados. Os estudos realizados no presente trabalho utilizaram técnicas moleculares baseadas em dois genes do DNA mitocondrial, COI e rRNA 16S, para elaborar e avaliar hipóteses dos fatores históricos que levaram à distribuição atual das populações existentes, assim como, compreender a história evolutiva desta espécie. Para o gene COI foram avaliadas 148 seqüências provenientes de 28 populações e para o gene rRNA16S, 65 seqüências provenientes de 15 populações. As análises filogeográficas de ambos os genes permitiram a obtenção de uma rede onde os haplótipos provenientes das populações de carunchos mexicanos e peruanos formaram duas linhagens independentes. Ambas as linhagens apresentaram alta diversidade genética. As populações brasileiras do *A. obtectus* permitiram a identificação de duas linhagens mitocondriais distintas, ambas com baixa diversidade genética e, possivelmente, originadas da linhagem mesoamericana. Provavelmente, as populações brasileiras foram introduzidas uma única vez, formando duas linhagens genéticas ancestrais ou foram introduzidas em dois eventos distintos da mesma fonte. A distribuição geográfica dos haplótipos no Brasil permitiu concluir que uma das linhagens brasileiras está alocada mais na região sul do país e a outra está amplamente distribuída em 25 das 28 populações amostradas neste estudo. A colonização do feijão brasileiro pelos carunchos mexicanos, possivelmente aconteceu através dos índios no período pré-colonial e, posteriormente, foram levados para a Europa e África no período da colonização do Brasil.

## CHAPTER I

---

### DIVERSITY AND MOLECULAR EVOLUTIONARY HISTORY OF THE BEAN-WEEVIL (*Acanthoscelides obtectus*)

#### ABSTRACT

The bean weevil *Acanthoscelides obtectus* is a pest that causes great economic losses by attacking stored common beans (*Phaseolus vulgaris*). The studies carried out in the present work used molecular techniques based on two mitochondrial DNA genes, COI and rRNA 16S, to elaborate and evaluate hypotheses about the historical factors which led to the current distribution of the existing populations and to understand the evolutionary history of this species. 148 sequences from 28 populations were evaluated for the gene COI, and 65 sequences from 15 populations were evaluated for the gene rRNA16S. The phylogeographical analyses of both genes allowed the achievement of a network where the haplotypes from the populations of Mexican and Peruvian weevil formed two independent lineages. Both lineages presented high genetic diversity. The Brazilian populations of *A. obtectus* allowed the identification of two different mitochondrial lineages, both with low genetic diversity and, possibly, derived from the Mesoamerican lineage. Probably, the Brazilian populations were introduced one single time, forming two ancestral genetic lineages or were introduced in two different events, coming from the same source. The geographical distribution of the haplotypes in Brazil led to the conclusion that one of the Brazilian lineages is mainly located in the south region, while the other is widely distributed in 25 out of the 28 populations sampled in this study. The colonization of the Brazilian beans by Mexican *Acanthoscelides obtectus* has possibly occurred

through the Indians in the pre-colonial period. Later, they were taken to Europe and Africa in the period of the Brazilian colonization.

## INTRODUÇÃO

Evidências baseadas em padrões eletroforéticos da fração protéica faseolina sugerem que o feijão comum, *Phaseolus vulgaris* L., foi domesticado independentemente em dois centros primários, os quais originaram os principais grupos de cultivares. Um centro primário de domesticação estaria localizado na América Central e México e o segundo centro na região do sul dos Andes. Entretanto, um terceiro centro, mais recente, localizado na região da Colômbia foi proposto por Van Schoonhoven (1991) e Gepts *et al.* (1986). Múltiplas domesticações nos dois centros primários levaram à formação de dois conjuntos gênicos principais, um Mesoamericano e um Andino, dentro dos quais, forças evolutivas têm resultado em significativas mudanças morfológicas, fisiológicas e genéticas (Van Schoonhoven, 1991).

Gepts *et al.*, 1988, sugeriram três hipóteses para explicar a introdução do feijão do Brasil. Na primeira, o feijão cultivado no Brasil seria originário de introduções provenientes do México, com uma rota que incluiria passagem pelo Caribe, Colômbia e Venezuela até chegar ao Brasil. A segunda hipótese propõe uma rota alternativa, pela qual o feijão teria chegado ao Brasil vindo dos Andes. A terceira hipótese implica numa origem recente para o feijão no Brasil, uma vez que ela sustenta que foram trazidos por imigrantes da Europa para o Brasil. As duas primeiras hipóteses implicam que o cultivo do feijão no Brasil antecederia a colonização européia, enquanto que a terceira hipótese não exclui a possibilidade de origem múltipla para o feijão no Brasil.

O caruncho-do-feijão, *Acanthoscelides obtectus*, possui origem neotropical e se especializou em alimentar-se de grãos do grupo *Phaseolus vulgaris*. A dispersão deste inseto em função da domesticação do feijão comum evidencia a relação co-evolutiva entre estas duas espécies. O papel da migração mediada por ações humanas é de extrema importância para o entendimento da história biogeográfica do *A. obtectus*. O fato da capacidade de dispersão ter sido artificialmente aumentada desde a domesticação do feijão comum há cerca de 7000 anos atrás reforça essa hipótese (Alvarez *et al.*, 2005). Por intermédio de migrações mediadas por ações humanas desde a domesticação e difusão da cultura do feijão, este bruquídeo passou a ser cosmopolita e se tornou uma das principais pragas do feijão armazenado em todo o mundo (Alvarez *et al.*, 2005, Delgado-Salinas *et al.*, 1999). No Brasil, por exemplo, as perdas na produção devido aos danos causados por *A. obtectus* juntamente com *Zabrotes subfasciatus*, outro caruncho do feijão, são de 20 a 30% (Magalhães & Carvalho, 1988).

A história evolutiva tanto do feijoeiro quanto do caruncho pode ser estudada por meios filogeográficos. A filogeografia é um método que combina análises filogenéticas e distribuição geográfica para mapear as histórias espacial e temporal, de linhagens intraespecíficas do DNA mitocondrial (Avice, 2000). Nos últimos anos, os estudos filogeográficos têm crescido de forma considerável permitindo descrever uma quantidade de variação e sub-estruturação intra-específica que, na maior parte das espécies, era imperceptível. A filogeografia pode revelar complexos processos que conduziram à domesticação, bem como mostrar facetas históricas de diversas espécies economicamente importantes, assim como a

conservação de recursos genéticos (Beheregaray, 2008, Beja-Pereira & Almeida, 2005). Recentes trabalhos, com abordagem filogeográfica, têm sido destacados em culturas e pragas economicamente importantes como a dispersão do gorgulho de algodão no sudeste dos Estados Unidos (Kim & Sappington, 2004), estudo filogeográfico de *Busseola fusca*, uma importante praga do milho (Sezonlin *et al.*, 2006) e filogeografia do feijão comum nas Américas (Chacón *et al.*, 2007).

No presente estudo, foi utilizado uma abordagem filogeográfica com base em dados de sequenciamento dos genes COI e rRNA16S, provenientes de populações de *A. obtectus* amostradas no Brasil, México, Peru, Europa e África, para responder as seguintes questões:

- a) Qual seria a origem das populações brasileiras de *A. obtectus*? Ou seja, as atuais populações brasileiras de *A. obtectus* seriam derivadas de populações ancestrais localizadas no México, ou no Peru, ou em ambos os centros de domesticação do hospedeiro? Ou, alternativamente, haveria uma fonte distinta?
- b) As atuais populações brasileiras de *A. obtectus* seriam resultantes de um único evento de introdução ou seriam resultantes de múltiplos eventos?
- c) Apesar das intervenções das ações humanas na dispersão da espécie no Brasil, devido a grande difusão e transporte de sementes, ainda assim haveria uma estrutura filogeográfica presente na micro- ou na macro-escala geográfica brasileira?
- d) Finalmente, haveria conhecimentos suficientes para que se possa formular uma hipótese a respeito da migração histórica e distribuição atual de *A. obtectus* no Brasil?

## METODOLOGIA

### Amostragem das populações

Sementes do feijão, *Phaseolus vulgaris*, não tratadas e infestadas com as duas principais espécies de carunchos, *A. obtectus* e *Z. subfasciatus*, foram adquiridas diretamente de pequenos produtores rurais de diversas regiões do Brasil. Estes produtores se caracterizavam por apresentar produção de subsistência, mais sujeita a menor fluxo gênico e assim estar amostrando populações localmente adaptadas. As amostras foram enviadas para o laboratório de sequenciamento de DNA no BIOAGRO-UFV onde foram mantidas individualizadas e em condições ambientes para a multiplicação do inseto. A figura 1 apresenta as amostras recebidas do Brasil, entretanto, algumas populações não puderam ser utilizadas porque não continham a espécie *A. obtectus*, a qual tem preferência por climas frescos de maior altitude (Abate & Ampofo, 1996).



**Figura 1-** Localização geográfica das populações de *Acanthoscelides obtectus* e *Zabrotes subfasciatus* no Brasil.

A Tabela 1 apresenta as populações brasileiras utilizadas neste estudo, e as respectivas coordenadas geográficas dos locais de coleta das amostras. As coordenadas foram estimadas com base na localização da cidade de origem, através do aplicativo Google Earth versão 3.0.

Para análise filogeográfica do *A. obtectus*, foram utilizados os genes mitocondriais COI e rRNA16S.

Para o gene COI foram utilizados 88 indivíduos distribuídos em 28 populações de 11 estados brasileiros e 8 indivíduos da África do Sul. Para estudo do gene rRNA16S foram analisados 37 indivíduos provenientes de 15 populações brasileiras e 8 indivíduos oriundos da África do Sul. Estes últimos foram adquiridos da “Cedara Agricultural Research Station”, Pietemartitzburg, África do Sul, acondicionados em etanol 70%. Os insetos foram coletados entre 2005 e 2008, mantidos em etanol 70% e estocados em freezer à -20°C.

Todos os indivíduos utilizados nos experimentos foram identificados visualmente sob microscópio estereoscópico como sendo *A. obtectus*, pelas características de morfologia externa, ou seja, pela presença de três estruturas em forma de dente na parte posterior do fêmur (Rees, 1996).

### **Extração de DNA, amplificação e sequenciamento**

O DNA genômico total foi extraído de cada inseto individualmente usando o protocolo adotado por Clark *et al.* (2001) com algumas modificações. Cada inseto foi macerado individualmente em nitrogênio líquido e posteriormente foi acrescentado 500 µL de tampão CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 mM NaCl<sub>2</sub>; 0,02M EDTA, pH 8,0; CTAB (2%) e β-

mercaptoetanol (0,2%, adicionado separado dos demais componentes do tampão). Posteriormente adicionou-se 5µL de proteinase K (40 mg/mL). As amostras foram homogeneizadas em agitador tipo vórtex e incubadas à 65°C em banho-maria por 60 minutos. Após incubação adicionou-se 15µL de RNase A (50 mg/mL), seguida de nova homogeneização e incubação à 37°C por 150 minutos. As amostras foram centrifugadas por cinco minutos à 10.400 rpm e o sobrenadante transferido para novo microtubo. Posteriormente adicionou-se 500µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v), seguindo-se nova centrifugação à 10.400 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi então precipitado com 500 µL de isopropanol mantido à -20°C e incubado na mesma temperatura durante a noite. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 10.400 rpm, descartando-se o sobrenadante. Efetuou-se duas lavagens com etanol 70% e etanol 95% respectivamente e o pellet foi seco em temperatura ambiente. Após a etapa de extração, o DNA foi ressuspenso em tampão TE 0,1M e estocado à -20°C. Para os insetos mortos foi utilizado DNeasy Kit (QIAGEN) seguindo protocolo do fabricante. Fragmentos do mtDNA foram amplificados pela reação da polimerase em cadeia (PCR), utilizando os *primers* L2-N-3014 (5'-TCCATTGCACTAATCTGCCATATTA-3') e C1-J-2183 (5'-CAACATTTATTTTGATTTTTTGG-3) para o gene COI e os *primers* 16Sbr (5'CCGGTTTGAAGTCAAGATCATGT-3') e 16Sar (5'-CGCCTGTTTAACAAAAACAT-3') para o gene rRNA16S, como descrito por Alvarez *et al.* (2005). A amplificação pela PCR, para ambos os genes, foi realizada num volume final de 25µL, contendo 3 µL de DNA (aproximadamente 40ng), 5µL de tampão IVB-5X (Phoneutria), 2µL de

dNTPs a 4 $\mu$ M, 1 unidade de Taq polimerase (Phoneutria), 2 $\mu$ L de cada primer e água ultra pura.

**Tabela 1-** Populações amostradas com seus respectivos códigos, tamanho das amostragens (N e N') para os genes COI e rRNA16S, respectivamente, e localização geográfica.

<b>Acessos</b>	<b>Código</b>	<b>N</b>	<b>N'</b>	<b>Latitude(S)</b>	<b>Longitude (W)</b>
São João- PE	SJA	7	5	7°37'59.92"	37°38'59.80"
Cacoal- RN	RON	5	5	11°24'31.37"	61° 26'38.20"
Sto. Antônio de Goiás- GO	SAG	2		16°29'11.36"	49°18'46.37"
Aquidauana- MS	AQU	5	2	20°28'28.59"	55°47'14.99"
Montes Claros- MG	MOC	7	3	16°44'13.25"	43°51'53.06"
Governador Valadares- MG	GOV	2		18°40'17.30"	42°20'41.42"
Hematita- MG	HEM	2		19°31'00.00"	43°06'17.14"
Bom Jesus do Amparo- MG	BJA	3	1	19°42'01.84"	43°28'41.16"
Taparuba- MG	TAP	2		19°46'00.74"	41°37'21.42"
São Miguel do Anta- MG	SMI	2		20°42'51.40"	42°45'14.52"
Viçosa- MG	VIC	1		20°40'20.22"	42°59'40.72"
Ervália- MG	ERV	2		20°50'35.05"	42°39'32.19"
Coimbra- MG	COI	1		20°50'58.84"	42°47'27.04"
Córrego de São João- SP	CSJ	1	1	21°08'42.91"	51°05'27.09"
Lavras- MG	LAV	2	1	21°14'44.65"	44°59'59.20"
Santa Maria- ES	SMA	7	3	21°11'07.18"	41°06'17.14"
Campos dos Goytacazes- RJ	CAM	2		21°45'08.20"	41°20'00.42"
Macaé- RJ	MAC	3	3	22°35'58.78"	42°20'00.42"
Jaboticabal- SP	JAB	2		21°15'19.40"	48°19'20.70"
Herculândia- PR	HER	2		23°16'11.49"	53°24'04.54"
Maringá- PR	MAR	4	1	23°29'47.84	52°06'41.81"
Campo Mourão- PR	CMO	4	2	24°08'20.04"	52°36'51.60"
Toledo- PR	TOL	3	2	24°43'11.50"	53°44'35.81"
Xanxerê- SC	XAN	1		26°53'09.07"	52°24'53.16"
Xaxim- SC	XAX	1		26°56'55.98"	52°31'38.23"
Piratuba- SC	PIT	5	3	27°24'29.08"	51°45'07.43"
Sobradinho- RS	SOB	6	3	29°25'21.92"	53°01'57.12"
Herval- RS	HEV	4	2	32°00'46.44"	53°24'11.24"
Africa do sul	AFR	8	8		
<b>Total</b>		<b>96</b>	<b>45</b>		

A amplificação por PCR para o gene COI foi realizada com um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos seguidos por um programa de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 1,5 minutos e um ciclo de extensão final de 72°C por 10 minutos. Para o gene

rRNA 16S a amplificação foi conduzida com um ciclo de desnaturação inicial a 92°C por 1,5 minutos, seguido por um programa de 30 ciclos de 92°C por 30 segundos, 42°C por 45 segundos e 72°C por 1,5 minutos e um ciclo de extensão final de 72°C por 10 minutos. As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). A PCR gerou fragmentos os quais foram amplificados e depois separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, contendo 0,2µg/ml de brometo de etídeo em condições constantes de tensão a 100 Volts e em tampão TBE 1X (Tris-borato 0,09M e EDTA 0,002M). Os fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta e suas imagens digitalizadas em um sistema de captura de imagens Eagleye. As amostras que apresentaram um padrão de amplificação de boa qualidade, ou seja, maior ou igual a 30ng DNA/µL, foram purificados utilizando kit QIA-quick (QIAGEN) para purificação dos produtos da PCR. Para as demais amostras que não apresentaram uma considerável qualidade de produtos de amplificação, foi realizada clonagem em células de *Escherichia coli* DH5α ultracompetentes com vetor pGEM T-Easy (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. As reações de sequenciamento dos fragmentos amplificados e clonados, que apresentavam concentração de DNA em torno de 30 a 40 ng/µL, foram sequenciadas pelo sequenciador automatizado, “MegaBace DNA Analysis System 500” (Amersham Biosciences Corp.). Para os produtos de PCR e clones foram realizados um sequenciamento por indivíduo. Para as seqüências dos clonadas que apresentaram mutação de base, foi realizado um segundo sequenciamento a partir de uma outra colônia positiva diferente. Este sequenciamento teve como objetivo, confirmar a mutação ocorrida no

primeiro sequenciamento. Foram utilizados, para os produtos da PCR, o mesmo iniciador do gene COI e rRNA16S e o iniciador universal M13 para os produtos clonados. Para todos os sequenciamento foram utilizados *primers forward e reverse*.

### **Análise das seqüências e estimação da rede de haplótipos**

As seqüências foram importadas para o aplicativo computacional SEQUENCHER version 4.1.4 (Gene Codes Corps.), onde foram alinhadas manualmente. Juntamente as seqüências obtidas foram adquiridas seqüências disponíveis no banco de dados. Desta forma, dois, bancos de dados foram gerados, um para cada gene. Para o gene COI, 52 seqüências foram obtidas do GenBank (AY676622 a AY676647, AY826483 a AY826505, AY881196 a AY881201). Estas seqüências são referentes às amostras obtidas no México (34), Peru (10), Camarões (3), Suíça (3), Espanha (1) e França (1). Para estudo do gene rRNA16S foram obtidos 23 seqüências (acessos AY826461 a AY826480) relativas aos carunchos do México (9), Peru (10), Camarões (1) Suíça (1), Espanha (1) e França (1). Após o alinhamento foram eliminadas as partes que não eram comuns a todas as seqüências. Foi utilizado o programa computacional NETWORK 4.5.0.2 (Fluxus Technology Ltd.) para evidenciar a relação de parentesco entre as seqüências e construção da genealogia dos genes mitocondriais COI e rRNA16S.

## RESULTADOS

### Gene COI

Após alinhamento das seqüências e retirada das extremidades para eliminar fragmentos que não estavam presentes em todos os indivíduos, o banco de dados do gene COI ficou constituído de 148 seqüências alinhadas e cada seqüência com 736 pares de bases cada. Entre as 148 seqüências, 88 foram obtidas do Brasil, oito da África do Sul e 52 foram obtidas do banco de dados (GenBank). Foram encontrados 37 haplótipos entre as 148 seqüências analisadas para o gene COI. As seqüências diferiram entre si por 63 substituições de bases e nenhum indel (inserção ou deleção) foi observado. Os sítios polimórficos do fragmento do gene COI estão dispostos em relação ao haplótipo 1, utilizado como referência (Figura 2). Três seqüências provenientes do banco de dados apresentaram a base ambígua N na posição 321 (AY826494) e na posição 741 (AY826491 e AY826493). A posição relativa a estas bases, em todas as 148 sequencias, foi desconsiderada nas análises subseqüentes. A composição de bases do segmento amplificado do COI foi maior para timina e adenosina em relação à citosina e guanina (A: 29,7%, C: 17,3%, G: 16,0%, T: 37,0%).

	11111111111222222222222334444444445555555666666777	
	03456666679900122556689022444568899371112233781347789004678111	Nº Acesso
	91080134720318805672838145039615847342343658173704887366099467	GenBank
H #		
1 76	AGAGCAGAGCATAAGGAAAATGAAAAAGTTAAAGTTGTCCACAATCAGATCTTCTTTTGTGA	AY881200
2 1	.....T.....	
3 2	.....G.....	
4 8	.....C.G.....T..T.....	
5 2	.....T..T.....	
6 1	.....C.....	
7 1	.....A.....C.G.....T..T.....	
8 1	.....C.G.....T..T..G.....	
9 1	.....C.....	
10 1	.....C.G.....T..TG.....	
11 1	..G.....	
12 1	.....C.....	
13 8	.....A.....T..T.....	*
14 3	.....A.....TG..T.....	*
15 1	.....A.....C.....T..T.....	AY676636
16 1	.....A.....T..T.....C.....	AY676645
17 1	.....A.....T.T..T.....	AY676639
18 1	.....A.....T..T.....A..	AY676634
19 2	.....A.....CA.....T..T.....	AY826487/88
20 1	.....G.....AG..T..T.....	AY676644
21 2	.....A.....T..A..T.A.....T..T.....T.....	*
22 2	.C...A.....T..T.....	AY826494/95
23 1	.C...A.....A.....T..T.....	AY826496
24 2	.....A.....T..T.....G	*
25 1	.....A..GC.....T..T.....C..C.....	AY676627
26 2	.....A.C.C...G.....A..T..T.....C....C.G.	*
27 1	.CCC.TATC.C..C.TC.....AG..T..T...C.C....C.G.	AY676641
28 6	...T.A.....A.....C.....T.....T	*
29 1	.C..T.A.....A.....C.....T.....T	AY826500
30 3	...T.A.....A.....C.....T.....T	AY826503-05
31 1	...T.A.....A.....C.....C.....T.....C.....T	AY826502
32 1	T..T.A.....A.....C.....T.....T	AY826490
33 1	.C..T.A.C.....A.....C.....T.....C...G...T	AY826501
34 3	.....GC.GG.....T..T.....	*
35 3	.....T.....GC.G.....T..T.....	*
36 2	.....C.....T.T..T.....	AY826491/93
37 1	.....G.....GG...G...C...TGT.GCT.A..T..TC.....	

**Figura 2-** Alinhamento das 128 sequências, com seus respectivos sítios polimórficos, de *Acanthoscelides obtectus* para o gene parcial COI, definindo 37 haplótipos. Cada fragmento possui 736 bases, os pontos indicam similaridade ao haplótipo 1, H indica o haplótipo e # o número de indivíduos que apresentou cada haplótipo. Os números indicam a posição dos nucleotídeos variáveis, considerando o haplótipo 1 como sequência de referência. Os asteriscos representam os números dos acessos no GenBank para cada haplótipo indicado. Número de acessos do haplótipo 13: AY676626, AY676628, AY676629, AY676635, AY676638, AY826489, AY881198, AY881196; haplótipo 14: AY676630, AY676632, AY826492; haplótipo 21: AY676637 e AY881201; haplótipo 24: AY676640 e AY 881197; haplótipo 26: AY676633 e AY881199; haplótipo 28: AY826497 a AY826499, AY 826446, AY82644, AY826486; haplótipo 34: AY676624, AY676625, AY826484; haplótipo 35: AY676622, AY676623, AY826483.

## Gene rRNA16S

Após edição e alinhamento das seqüências, o banco de dados do gene rRNA16S ficou constituído por 65 seqüências alinhadas, contendo 447 pares de bases cada. Das 65 seqüências analisadas de *A. obtectus*, 37 foram obtidas do Brasil, oito da África do Sul e 23 foram adquiridas do banco de dados (nove do México, 10 do Peru, uma da França, uma da Espanha, uma da Suíça, uma de Camarões). As seqüências diferiram entre si por cinco substituições de bases e nenhum *indel* (deleção ou inserção) foi observado. Na Figura 3 são apresentados os cinco sítios polimórficos em relação ao haplótipo A, utilizado como referência. A composição de bases para o fragmento de gene rRNA16S foi maior para timina e adenosina em relação à citosina e guanina (C:15,8%, T:36,1%, A:39,6% e G:8,5%).

	13	
	11280	Nº acesso
	34476	GenBank
H #		
A 37	TTGAT	AY8226460, AY826468
B 10	...GC	*
C 7	.C...	*
D 11	CCA..	*

**Figura 3-** Alinhamento das 65 seqüências, com seus respectivos sítios polimórficos, de *Acanthoscelides obtectus* para o gene parcial rRNA16S, definindo 4 haplótipos. Cada fragmento possui 447 bases, os pontos indicam similaridade ao haplótipo A considerado referência, H indica cada haplótipo e # o número de indivíduos que apresentaram cada haplótipo. Os números indicam a posição dos nucleotídeos variáveis em relação ao haplótipo de referência A. Os asteriscos representam os números dos acessos no GenBank para cada haplótipo indicado. Número de acessos do haplótipo B: AY826458,AY826459,AY826466; haplótipo C: AY826462, AY826463, AY826464, AY826467, AY826469, AY826470, AY826471; haplótipo D: AY826461, AY826465, AY826472 a AY826480.

## **Estrutura genealógica e geográfica**

A distribuição dos haplótipos do *A. obtectus* está presente na Tabela 2. No Brasil, foram detectados 12 haplótipos, sendo que 8 destes haplótipos foram *singletons*, ou seja, haplótipos únicos exclusivos de uma localidade. O haplótipo 1 foi o mais freqüente, aparecendo em 69 dos 88 indivíduos amostrados. O haplótipo 4 foi o segundo mais freqüente, estando presente em 7 indivíduos brasileiros. Os haplótipos 1 e 4 foram observados com maiores freqüências no Brasil e compartilhados com o México, Espanha e África do sul e os outros 10 foram exclusivos do Brasil. As seqüências obtidas do México permitiram a identificação de 18 haplótipos, sendo 15 exclusivos. O haplótipo 13 foi o mais comum, estando presente em 8 dos 34 indivíduos analisados. No Peru foram detectados cinco haplótipos exclusivos e um compartilhado com o México (haplótipo 28). Na Europa foram encontrados três haplótipos, um compartilhado com o Brasil, um com o México e um exclusivo da Suíça. Quatro haplótipos foram obtidos na África, um exclusivo de Camarões e um da África do Sul e dois compartilhados com o Brasil.

**Tabela 2-** Distribuição de 37 haplótipos referentes ao gene COI entre 148 seqüências analisadas de *Acanthoscelides obtectus*. (N) refere-se ao número de seqüências analisadas por grupo, (Hs) o número total de haplótipos encontrados por grupo e (H<sub>SH</sub>) o número de indivíduos que compartilham determinado haplótipo.

		Haplótipos COI																																					
	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	H <sub>S</sub>
<b>Acessos</b>																																							
Brasil	88	69	1	2	7	2	1	1	1	1	1	1	1																									12	
México	34	1												8	3	1	1	1	1	2	1	2	2	1	2	1	2	1	3								1	18	
Peru	10																											3	1	3	1	1	1				6		
Europa	5	1																															3		1		3		
África	11	6			1																														3		1	4	
<b>H<sub>SH</sub></b>	<b>148</b>	<b>77</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	

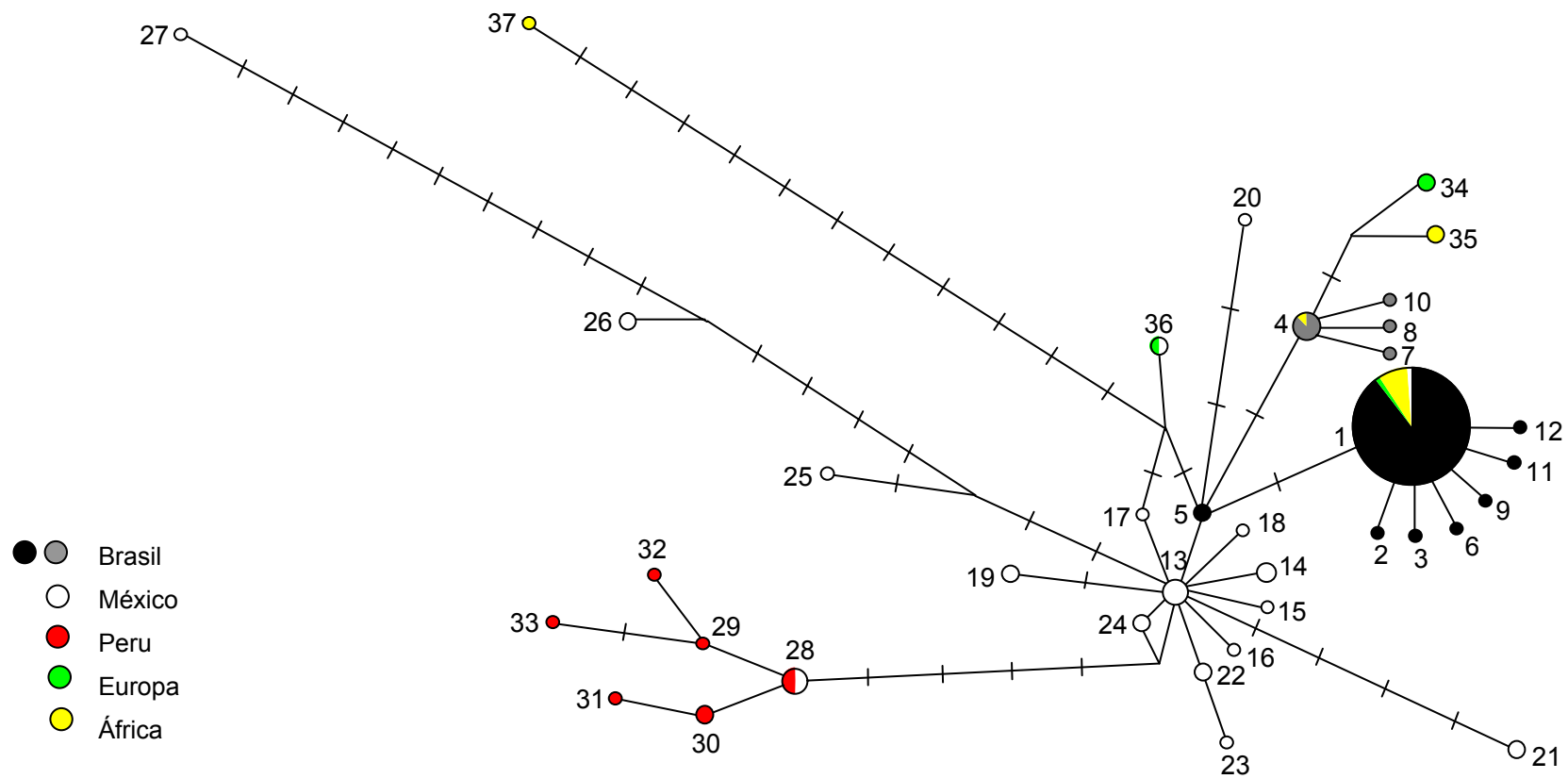
A tabela 3 apresenta os quatro haplótipos do gene rRNA16S detectados em 65 indivíduos de *A. obtectus*. No Brasil, foram encontrados dois haplótipos (A e B) em 37 indivíduos analisados. O haplótipo A foi o que obteve distribuição geográfica mais ampla, com 30 indivíduos distribuídos em 13 das 15 localidades amostradas. O haplótipo B esteve presente em seis indivíduos amostrados, e compartilhado com a Europa e África. O haplótipo C foi obtido exclusivamente em indivíduos de origem mexicana. O México obteve a maior diversidade genética, possuindo três haplótipos dos quatro detectados em todas as populações analisadas. As seqüências obtidas dos carunchos peruanos permitiram a identificação de um haplótipo (D), o qual esteve presente em todos os 10 indivíduos, sendo compartilhado com o México.

**Tabela 3-** Distribuição de quatro haplótipos referentes ao gene rRNA16S entre 65 seqüências analisadas de *Acanthoscelides obtectus*. (N) refere-se ao número de seqüências analisadas por grupo, (H<sub>s</sub>) o número total de haplótipos encontrados por grupo e (H<sub>SH</sub>) o número de indivíduos que compartilham determinado haplótipo.

<b>Haplótipos rRNA16S</b>						
	<b>N</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>H<sub>s</sub></b>
<b>Acessos</b>						
Brasil	<b>37</b>	<b>30</b>	<b>7</b>			<b>2</b>
México	<b>9</b>	<b>1</b>		<b>7</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
Peru	<b>10</b>				<b>10</b>	<b>1</b>
Europa	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>			<b>2</b>
África	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>2</b>			<b>2</b>
<b>H<sub>SH</sub></b>	<b>65</b>	<b>39</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>11</b>	

## **Rede de haplótipos e distribuição geográfica**

A rede de haplótipos referente ao gene COI está representada na figura 4. Os 37 haplótipos distinguidos foram separados por 31 passos de mutação. A rede apresenta duas ambigüidades as quais não puderam ser resolvidas pelo cladograma estatístico parcimonioso. O haplótipo 13 está presente nestes dois exemplos, primeiro, conectando-se ambiguamente ao haplótipo 28 e em segundo caso, conectando-se aos haplótipos 36 e 37. Haplótipos relativos aos carunchos mexicanos ocuparam posição central na rede, sendo que o haplótipo 13 apresentou-se multifurcado. O haplótipo 27, detectado em um indivíduo mexicano, apresentou-se na extremidade da rede, assim como o 37, pertencente a um indivíduo africano. De acordo com a rede, todos os 12 haplótipos encontrados nos carunchos brasileiros foram derivados de uma linhagem genética oriunda do México. O haplótipo 1 foi mais amplamente distribuído seguido pelo 4, ambos possuem o mesmo número de passos de mutações em relação ao haplótipo central mexicano. Os haplótipos pertencentes à Europa e África estão presentes nas extremidades da rede e apresentam relações com os brasileiros e mexicanos, ou seja, são linhagens derivadas destes dois países.

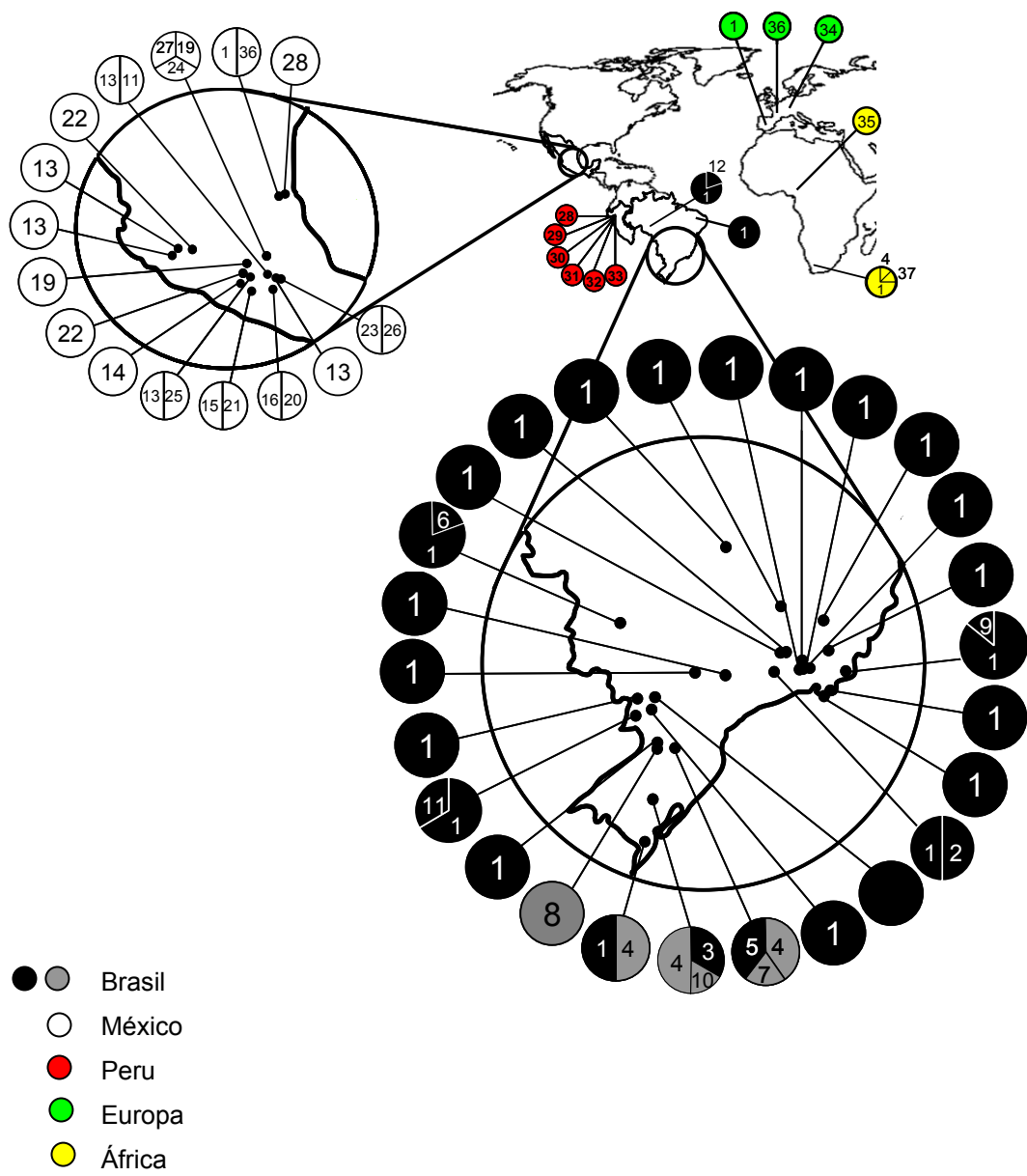


**Figura 4-** Rede de haplótipos do gene COI em *A. obtectus* gerada pelo programa Network. Os números descritos referem-se aos haplótipos das seqüências descritas na figura 2. Cada linha representa um evento de mutação e os traços representam haplótipos não amostrados ou extintos.

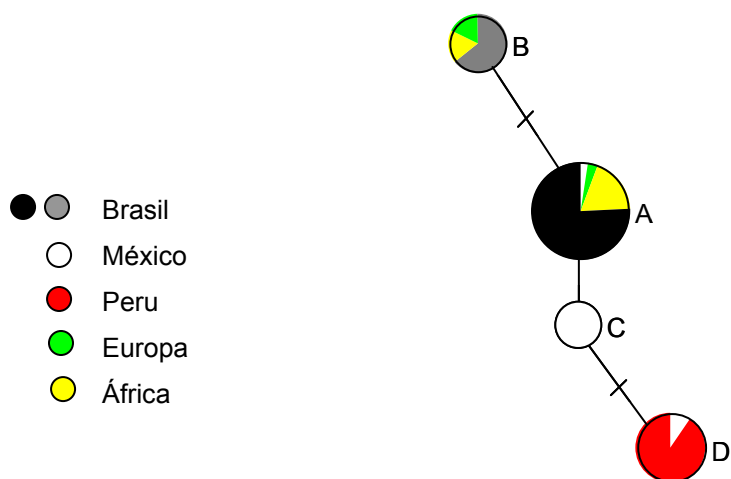
A figura 5 apresenta a distribuição geográfica dos 37 haplótipos de *A. obtectus*. No Brasil o haplótipo 1 foi o mais amplamente distribuído e está presente em todas as regiões amostradas do Brasil. O haplótipo 4 foi o segundo mais distribuído, sendo uma linhagem genética exclusiva do sul do Brasil. O haplótipo 13 foi o mais freqüente no México. No Peru, foram detectados seis haplótipos exclusivos em apenas uma população, indicando uma alta diversidade genética. A Europa e África apresentaram haplótipos exclusivos e únicos, embora compartilhem haplótipos brasileiros na sua maioria.

A figura 6 apresenta a rede de haplótipos para o gene rRNA16S. Os quatro haplótipos foram conectados de maneira parcimoniosa e não foi observada a presença de homoplasia. No Brasil foram detectados dois haplótipos (A e B), sendo o primeiro conectado ao haplótipo B e C. Novamente, como proporcionado pelo gene COI, o haplótipo B, oriundo do Brasil, África e Europa ocupam a extremidade da rede assim como o mais central foi relativo ao México, o qual foi amplamente distribuído neste país. O haplótipo D, esteve presente em todos os indivíduos peruanos e apresentou-se na extremidade da rede.

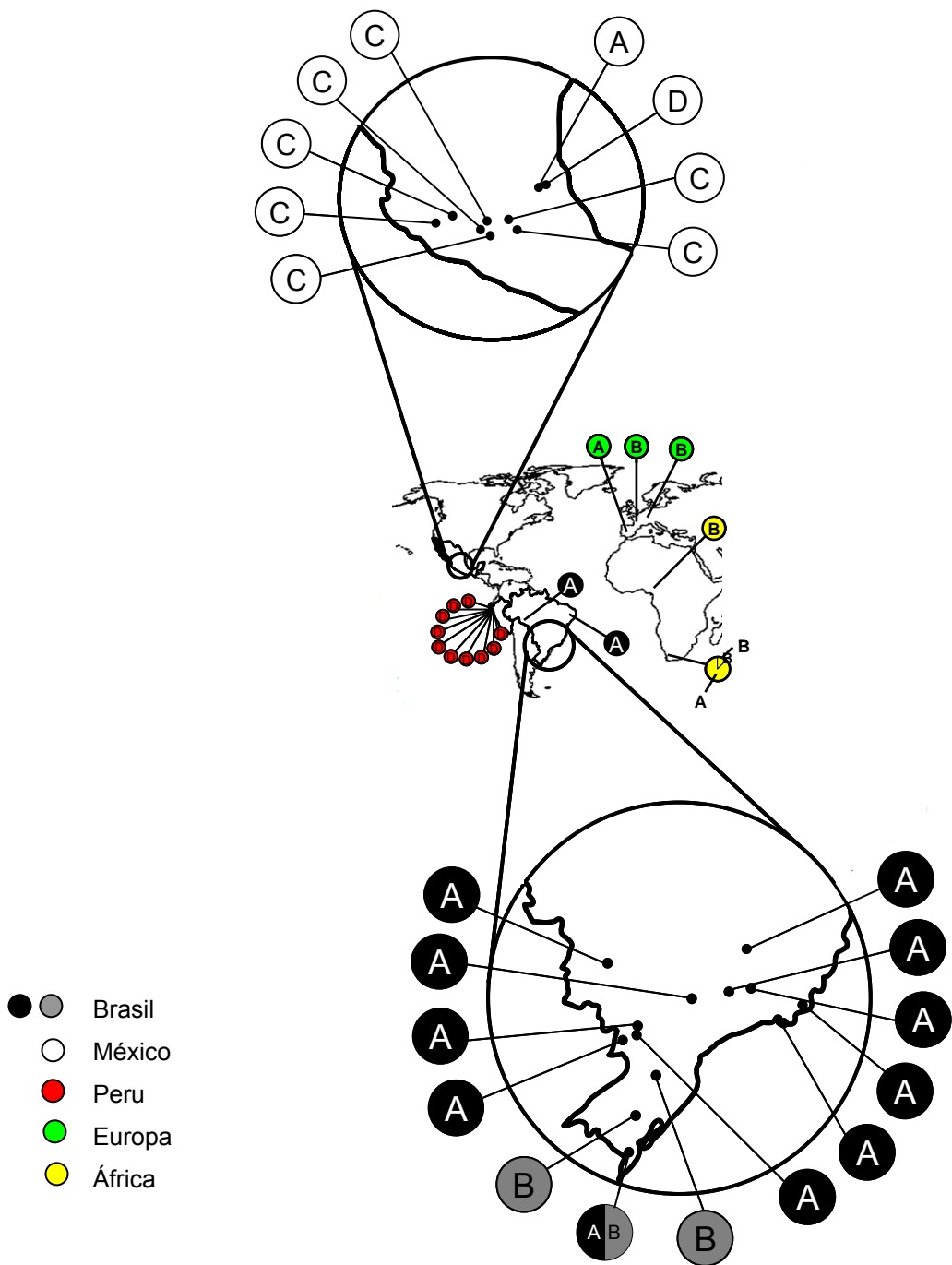
No Brasil, o haplótipo A foi o mais distribuído, estando presente em 13 populações amostradas. O haplótipo B, assim como na análise do gene COI, esteve restrito à região sul do país. Na Europa e África os haplótipos observados foram A e B compartilhados com o Brasil (Figura 7).



**Figura 5-** Distribuição geográfica dos 37 haplótipos do *Acanthoscelides obtectus*. Os números no mapa são referentes ao haplótipo de cada população.



**Figura 6-** Rede de haplótipos do gene rRNA16S em *Acanthoscelides obtectus* gerada pelo programa Network. As letras descritas referem-se aos haplótipos das seqüências descritas na Figura 3. As cores são referentes aos mesmos locais descritos da Figura 5.



**Figura 7-** Distribuição geográfica dos quatro haplótipos do *A. obtectus* para o gene mitocondrial rRNA16S. As letras no mapa são referentes ao haplótipo de cada população.

## DISCUSSÃO

### **Linhagens distintas nos centros de origem**

Análise filogeográfica com base nos genes mitocondriais COI e rRNA16S permitiram a inferência da existência de duas linhagens distintas do caruncho nos centros de origem: uma mesoamericana caracterizada pelos carunchos mexicanos e outra andina, representada pelos carunchos peruanos. A alta diversidade genética encontrada em *A. obtectus* oriundos do México e Peru indicam que estas duas áreas são centros de diversidade distintos para a espécie. Este resultado é consistente com os dois centros de origem propostos para *Phaseolus vulgaris*, o hospedeiro do inseto (Gepts 1990). A presença de duas linhagens diferenciadas geneticamente é compatível com a ausência de fluxo gênico no passado entre as duas áreas. A presença do haplótipo (28) nos carunchos provenientes do México e do Peru sugere uma dispersão recente entre os centros de origem. Essa dispersão foi possivelmente mediada por ações humanas, uma vez que o indivíduo que deu origem ao haplótipo 28 foi amostrado em uma área de cultivo de feijão que foi iniciada com sementes recentemente importadas do Peru (Nadir Alvarez, dados não publicados).

Os resultados mostraram que a distribuição da diversidade genética do inseto corresponde com a diversidade genética do hospedeiro, indicando evolução paralela em dois refúgios distintos que apareceram, provavelmente, com a domesticação do feijão. É sabido que o cultivo do feijão nestas duas áreas é de origem remota, sendo provável que a origem das duas linhagens ancestrais do caruncho tenha sido mantida com a domesticação do feijoeiro e se diferenciaram por mutação e deriva genética.

## Origem das linhagens do caruncho no Brasil

A maioria das populações brasileiras de *A. obtectus* apresentou somente um haplótipo, indicando uma baixa diversidade genética. Segundo Paabo *et al.* (2004), alguns genes selecionados durante a domesticação de espécies podem ser identificados por sua baixa variação comparada ao ancestral, explicando a baixa diversidade encontrada no Brasil. A baixa diversidade genética pode ser atribuída a uma dispersão recente de espécies invasivas (Sakai *et al.* 2001, Tsutsui *et al.* 2000). Bonizzoni *et al.* (2004) concluíram que na mosca da fruta mediterrânea houve uma redução significativa da diversidade genética, tendo menor variabilidade quando comparada à população original. Isto ocorre, segundo eles, devido à recente colonização e expansão desta espécie invasiva em diferentes continentes. A espécie invasiva do besouro da batata possui menor diversidade genética nas populações europeias sugerindo que um único evento fundador e recente introdução aconteceram neste continente (Grapputo *et al.*, 2005).

De acordo com a rede, todos os haplótipos brasileiros abordados neste estudo foram derivados de uma única linhagem genética oriunda do México (semelhante à Xochitlan/XOT). Os haplótipos brasileiros obtidos nas populações amostradas aparentemente não apresentaram nenhuma relação com os haplótipos peruanos. Os haplótipos peruanos apresentaram-se bem agrupados e separados do grupo mexicano podendo ser indicativo da existência de um centro de origem andino do *A. obtectus*. Ainda pode-se inferir que os haplótipos oriundos das populações africanas e europeias foram derivados do Brasil ou do México devido à ambigüidade apresentada na rede de haplótipos do gene COI.

Freitas (2003) realizou estudo de fragmentos de DNA em amostras de milho de antigas populações indígenas que habitaram na antiguidade a região do Vale do Peruaçu, no norte do estado de Minas Gerais, Brasil. Ele verificou que esta região recebeu influência genética mais intensa a partir da América Central e, aparentemente, não sofreram nenhuma, ou muito pouca influência, da região dos Andes. Este mesmo padrão de origem genética foi descrito, posteriormente, por Freitas (2006) em seu trabalho com a proteína faseolina do feijão comum também descoberto em sítio arqueológico no estado de Minas Gerais. Foi concluído que as faseolinas nestas sementes apresentaram maior similaridade mesoamericana do que a andina. Além disso, a bactéria *Risobium etli*, a qual oferece relação simbiote com *Phaseolus vulgaris*, é largamente encontrada em solos brasileiros. Análises de HPLC-PCR realizadas com a estirpe brasileira demonstraram alta similaridade com a mexicana contribuindo para dar suporte à teoria de intercâmbio e migração que ocorreu entre indígenas brasileiros e populações da América Central no período pré-colonial (Grange *et al.*, 2007). Estes resultados sugerem a origem e intercâmbio de espécies de alguns alimentos utilizadas por populações indígenas no período pré-colonial do Brasil e ainda apóiam a teoria da origem mesoamericana do caruncho do feijão.

### **Estrutura filogeográfica do caruncho no Brasil**

Apesar do intenso cultivo de feijão no Brasil e do grande trânsito entre as mais diversas regiões produtoras com sementes para plantio e grãos para consumo humano, o caruncho apresentou uma estrutura filogeográfica. Foram encontradas basicamente duas linhagens distintas de ampla

distribuição geográfica. A primeira encontrada em locais bem diversos como as populações obtidas de uma região de altitude em Pernambuco, outra em Rondônia e em praticamente todas as outras regiões do Brasil. A segunda linhagem genética teve distribuição geográfica restrita à região sul do país. Os haplótipos 1 e 4 referentes ao gene COI e os haplótipos A e B obtidos da análise do gene rRNA16S foram os mais amplamente distribuídos, portanto, pode-se supor que no Brasil pode ter ocorrido único ou duplo evento de colonização do *A. obtectus*. Sob uma análise parcimoniosa é mais provável que o caruncho tenha sido introduzido no país apenas uma única vez formando duas populações ancestrais que diferenciaram-se independentemente uma da outra, ou que houve duas introduções distintas da mesma fonte.

Embora houvesse a tentativa de se obter amostras da região norte do Brasil (Amazônia), região intermediária geograficamente entre as regiões brasileiras de cultivo do feijão e o México ou Peru, não foi adquirido em nenhuma população. Isto se deve ao fato do *P. vulgaris* não ser cultivado em regiões quentes e de baixa altitude (Abate & Ampofo, 1996). Nas regiões da Amazônia, os habitantes originais cultivavam o *Phaseolus lunatus* o qual não é hospedeiro do *A. obtectus*, mas sim do *A. argillaceus* (Kergoat *et al.*, 2005). Da mesma forma, nas regiões com temperaturas mais elevadas de diversos estados brasileiros, os feijões amostrados estavam colonizados pelo *Zabrotes subfasciatus*, outra espécie de caruncho fitófago predador do feijão comum.

Os resultados sugerem que o caruncho de origem andina não contribuiu para a diversidade do genoma mitocondrial do caruncho brasileiro,

embora, tenham sido obtidas amostras de feijão andino da região sul do Brasil, onde este tipo de feijão é cultivado. Ainda pode-se supor que caso exista a linhagem andina, ela tem distribuição restrita e estaria ausente das amostras deste estudo. Mesmo as amostras de feijão, obtidas de outras regiões que fazem fronteira com países andinos, como o Mato Grosso do Sul e Rondônia, apresentaram nenhuma relação com os carunchos andinos. A nossa hipótese era que os habitantes originais destas regiões poderiam ter estabelecido rotas de comércio com os povos andinos e que o feijão como hospedeiro do caruncho, poderia ter chegado ao Brasil dos Andes por estas vias de comércio. Entretanto, os resultados não são compatíveis com a hipótese de origem andina para o caruncho encontrado atualmente no Brasil.

Assim, podemos inferir que somente a linhagem mesoamericana parece ter contribuído para a origem do genoma mitocondrial do caruncho brasileiro. Como não foram utilizados genes nucleares nos estudos filogeográficos, não podemos eliminar por completo a possibilidade de que a linhagem andina possa ter contribuído para a diversidade genética do genoma nuclear e que a linhagem mitocondrial possa ter sido extinta.

As amostragens realizadas na Europa e África foram pequenas e não proporcionaram comparações a níveis de diversidade genética entre estas regiões e o Brasil. Assim, não foi possível verificar quais as relações de ancestralidades entre as populações brasileiras, africanas e europeias. Entretanto, os haplótipos pertencentes à Europa e África estão presentes nas extremidades da rede inferindo que sejam haplótipos mais recentes. Sob análise da rede de haplótipos ainda foi possível a inferência da origem dos carunchos africanos e europeus. Numa primeira perspectiva é provável que

os carunchos brasileiros tenham sido fontes para a colonização da África e Europa, tendo sido levado para estes países na época da colonização do Brasil. Num segundo momento, pode ser sugerido que a linhagem presente no sul do país tenha origem mexicana e por meio da Europa tenha chegado ao Brasil acompanhando os colonizadores europeus que chegaram mais recentemente nessa região. Esta última hipótese é menos provável, uma vez que em um estudo com feijão descoberto em sítio arqueológico em Minas Gerais mostraram que são de origem mesoamericana e não de origem andina (Freitas, 2006). Este argumento se torna mais sustentável quando se analisa o período de ocupação desta região que foi anterior a presença dos colonizadores portugueses no Brasil. Ainda pode-se inferir que os carunchos de origem brasileira podem ter sido levados uma única vez, contendo ambas as linhagens principais brasileiras. Entretanto, é possível que a colonização do feijão possa ter ocorrido duas vezes simultaneamente onde foram introduzidos independentemente às duas linhagens genéticas.

## CONCLUSÕES

- 1) Cada uma das duas regiões aceitas como sendo centro de domesticação do feijão comum possuem uma linhagem mitocondrial de *A. obtectus* (linhagem mesoamericana e linhagem andina). Estas duas linhagens apresentaram níveis elevados de diversidade genética.
- 2) As populações brasileiras de *A. obtectus* foram identificadas em duas linhagens mitocondriais, ambas possuindo baixos níveis de diversidade genética e sendo, possivelmente, derivadas da linhagem mesoamericana.
- 3) *A. obtectus* possivelmente foi introduzido no país apenas uma única vez e formou duas linhagens ancestrais por isolamento geográfico, ou alternativamente, existiram dois eventos distintos de introdução a partir de uma mesma fonte.
- 4) A estrutura filogeográfica do *A. obtectus* no Brasil consiste em uma linhagem mitocondrial que está geograficamente restrita ao sul do País e uma outra linhagem mitocondrial que está distribuída por todo o território nacional.
- 5) A presença de estrutura filogeográfica para o *A. obtectus* no Brasil não é compatível com uma introdução recente mediada pela ampla difusão do cultivo do feijão, mas pode ser melhor explicada pela presença dos bruquídeos anterior à colonização europeia.

- 6) A disseminação do cultivo do feijão no Brasil pode ter contribuído para a ampla dispersão de uma das linhagens mitocondriais brasileiras de *A. obtectus*, mas não está claro porque ela não contribuiu igualmente para a dispersão da linhagem que está restrita ao sul do País.
  
- 7) As duas linhagens mitocondriais brasileiras estão presentes tanto na Europa quanto na África; sugerindo uma dispersão secundária a partir do Brasil. Entretanto, uma amostragem mais ampla é necessária para confirmar esta hipótese.
  
- 8) Não foram encontradas evidências de que a linhagem mitocondrial andina tenha contribuído para as linhagens mitocondriais brasileiras de *A. obtectus*.

## REFERÊNCIAS

- Abate, T. & Ampofo, J.K.O. (1996). Insect pests of beans in Africa: Their ecology and management. **Annual Reviews of Entomology**, 41:45-73.
- Alvarez, N., McKey, D., Hossaert-McKey, M., Born, C., Mercier, L., Benrey, B. (2005). Ancient and recent evolutionary history of the bruchid beetle, *Acanthoscelides Obtectus* Say, a cosmopolitan pest of beans. **Molecular Ecology**, 14:1015-1024.
- Awise, J.C. (2000). **Phylogeography: The History and Formation of Species**, Harvard University Press, Cambridge, MA. 446p.
- Beheregaray, L.B. (2008). Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. **Molecular Ecology**, 17:1-21.
- Beja-Pereira, A., Almeida, N.F. (2005). **Genética Biotecnologia e Agricultura**, Editora Principia, Publicações Universitárias e Científicas. Porto, Portugal.
- Bonizzoni, M., Guglielmino, C.R., Smallridge, C.J. *et al.* (2004). On the origins of medfly invasion and expansion in Australia. **Molecular Ecology**, 13, 3845-3855.
- Chacón, M.I., Pickersgill B., Debouck, D.G., Arias, J.S. (2007). Phylogeographic analysis of the chloroplast DNA variation in wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Americas. **Plant Systematics and Evolution**, Published online: May 30.
- Clark, T.L., Meinke, L.J., Foster, J.E. (2001). Molecular phylogeny of *Diabrotica* beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) inferred from analysis of combined mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Insect Molecular Biology**, 10(4):303–314.

- Delgado-Salinas, A., Turley, T., Richman, A., Lavin, M. (1999). Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). **Systematic Botany**, 24:438-460.
- Freitas, F.O. (2006). Evidências genético-arqueológicas sobre a origem do feijão comum no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41(7):1199-1203.
- Freitas, F.O. (2003). Áreas de contato de populações pré-históricas, observado através do resgate de DNA de amostras arqueológicas de milho - *Zea Mays*, L. **Revista Arqueologia**, 16: 47-57.
- Gepts, P. (1990). Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (Fabaceae) beans. **Economic Botany**, 44, 28–38.
- Gepts P, Kmiecik K.; Pereira P., and Bliss F.A. (1988). Dissemination pathways of common beans ( *Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from Phaseolin electrophoretic variability. I. The Americas. **Economic Botany**, 42(1):73–85.
- Gepts P, Osborn T.C.; Rashka K, Bliss, FA. (1986). Phaseolin variability among wild and cultivated common beans ( *Phaseolus vulgaris* ) from Colombia. **Economic Botany**, 40:451–468.
- Grange, L., Hungria, M., Graham, P.H. (2007). New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, 39: 867–876.
- Grapputo, A., Bomam, S., Lindstrom, L. et al., (2005). The voyage of an invasive species across continents: genetic diversity of North American and European Colorado potato beetle populations. **Molecular Ecology**, 14, 4207-4219.

- Kergoat, G.J., Alvarez, N., Hossaert-Mckey, M. *et al.* (2005). Parallels in the evolution of the two largest New and Old World seed-beetle genera (Coleoptera, Bruchidae). **Molecular Ecology**, 14:4003-4021.
- Kim, k.S. & Sappington, T.W. (2004). Boll Weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) (Coleoptera: Curculionidae) dispersal in the Southern United States: Evidence from mitochondrial DNA variation. **Molecular Ecology and Evolution**, 33(2): 457-469.
- Magalhães, B.P. & Carvalho, S.M. (1988). Insetos associados à cultura. In: Zimmerman, M.J., Yamada, M.R.T. (ed). **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, p. 573-589.
- Paabo, S., Poinar, H., Serre D. *et al.* (2004). Genetic analyses from ancient DNA. **Annual Reviews of Genetics**, 38:645–79.
- Rees D.P. Coleoptera. In Subramanyan, B. & Hagstrum, D.W. (1996). **Integrated Management of Insects in Stored Products**. Marcel Dekker, Inc. New York, p.1-15.
- Sakai, A.K., Allendorf, F.W., Holt, J.S. (2001) The population biology of invasive species. **Annuals Reviews of Ecology Systematic**, 32:305-332.
- Sezonlin, M., Dupas, S., Le Rü, B. *et al.* (2006). Phylogeography and population genetics of the maize stalk borer *Busseola fusca* (Lepidoptera, Noctuidae) in sub-Saharan Africa. **Molecular Ecology**, 15: 407–420.
- Tsutsui, N.D., Suarez, A.V., Holway, D.A. *et al.* (2000). Reduced genetic variation and the success of an invasive species. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, 97:5948-5953.

Van Schoonhoven, A. (1991). **Common bean: Research for crop improvement**, Wallingford, UK: CAB, 980p.

## CAPÍTULO II

---

### ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO PROTEICO E DE CARBOIDRATOS EM POPULAÇÕES DO CARUNCHO-DO-FEIJÃO (*Acanthoscelides obtectus*)

#### RESUMO

Broqueadores de grãos leguminosos são responsáveis por severas perdas no armazenamento do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e podem diminuir seu valor nutricional. O *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae) se disseminou mundialmente pela comercialização dos grãos e se tornou uma praga agrícola importante. O processo de digestão do feijão em bruquídeos é baseado na atividade de proteases presentes no grão assim como das  $\alpha$ -amilases. Este trabalho avaliou a atividade proteolítica de cisteíno e serino-proteases e atividade amidolítica de *Acanthoscelides obtectus*, o caruncho-do-feijão. Dentre as quatro populações estudadas (Sobradinho, Viçosa, Cacoal e Bom Jesus do Amparo), a população Sobradinho apresentou maior atividade de serino e cisteíno-proteases quando comparado às demais populações. Estes resultados sugerem que Sobradinho apresenta metabolismo mais eficiente frente aos inibidores de proteases presentes nas sementes de feijão e evoluiu sob pressão de seleção distinta das demais populações analisadas. A população Viçosa apresentou maior atividade de amilase seguida pela população Bom Jesus do Amparo, enquanto que Cacoal e Sobradinho foram populações que apresentaram menor atividade de amilase, não diferindo estatisticamente entre si. Estes resultados podem estar associados a diferenças na susceptibilidade do caruncho aos inibidores de amilase do feijão nesta linhagem.

## CHAPTER II

---

### THE ACTIVITY OF ENZYMES PROTEIN METABOLISM AND CARBOHYDRATE IN POPULATIONS OF THE BEAN-WEEVIL (*Acanthoscelides obtectus*)

#### ABSTRACT

Broqueadores grain legumes are responsible for severe losses in the storage of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and may decrease its nutritional value. The *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae) has spread worldwide for marketing of grain and became an important agricultural pest. The process of digestion of beans in bruquídeo is based on the activity of proteases present in the grain as well as the  $\alpha$ -amylases. This study evaluated the proteolytic activity of cysteine and serine-protease activity and amidolítica of *Acanthoscelides obtectus*, the worm-the-beans. Among the four populations studied (Sobradinho, Viçosa, Cacoal and Bom Jesus do Amparo), the population Sobradinho showed increased activity of serine and cysteine proteases, compared to other populations. These results suggest that Sobradinho presents front of more efficient metabolism of protease inhibitors present in bean seeds and evolved under pressure of selection distinct from other populations analyzed. The population Viçosa showed higher activity of amylase followed by population Bom Jesus do Amparo, while Cacoal and Sobradinho were people showed lower activity of amylase, did not differ statistically among themselves. These results may be associated with differences in susceptibility to the weevil amylase inhibitors of the beans in this lineage.

## INTRODUÇÃO

O feijão comum, *Phaseolus vulgaris*, destaca-se como a leguminosa de maior importância para a alimentação humana (Boiça Jr. *et al.*, 2002, Araújo *et al.*, 1996). No Brasil, México e em grande parte da América Latina, o feijão constitui um dos alimentos básicos mais importantes como fonte protéica além de possuir elevado conteúdo energético quando comparado a alguns gêneros alimentícios (Franco *et al.*, 2005, Pedra *et al.*, 2003, Mazzonetto & Vendramim, 2002). O Brasil destaca-se no cenário internacional como o maior produtor mundial de feijão, tanto pela extensão da área cultivada quanto pelo volume da produção obtida (IBGE, 2008, Moda-Cirino, 2006). O cultivo do feijão no Brasil é realizado por pequenos produtores, porém sua produtividade é considerada baixa devido a vários fatores, dentre os quais se destaca o ataque por pragas e patógenos, desde a emergência até o armazenamento (Boiça Jr. *et al.*, 2002). Entre as principais pragas de feijão armazenado estão os carunchos *Acanthoscelides obtectus* e *Zabrotes subfasciatus* (Silva *et al.*, 2007, Pedra *et al.*, 2003, Ishimoto & Chrispeels, 1996). O ataque destes insetos pode causar perda do peso, redução do poder germinativo, do valor nutritivo, e desvalorização comercial dos grãos devido à presença de insetos mortos, ovos e excrementos (Boiça Jr. *et al.*, 2002).

A co-evolução inseto-planta ocorre quando duas ou mais espécies influenciam o processo evolutivo uma das outras. As interações inseto-planta podem resultar de evolução bioquímica, onde as plantas produzem inseticidas naturais que podem intoxicar insetos herbívoros e estes por sua vez desenvolvem mecanismos de desintoxicação, sendo um processo

dinâmico, sujeito a variações contínuas e mudanças (Ridley, 2006, Mello & Silva-Filho, 2002). Estudos sobre a variabilidade genética são relevantes, pois restrições no fluxo gênico entre populações apresentam um papel importante na evolução da adaptação local, incluindo evolução de biótipos (González-Rodríguez *et al.*, 2002).

O processo de digestão do feijão em bruquídeos é baseado na atividade de proteases presentes no grão. As serino (EC 3.4.21.4.) e cisteíno-proteases (EC 3.4.22) (CPs) estão diretamente envolvidas na degradação de proteínas intra- e extra-celulares, apresentando um papel chave na biodisponibilidade de aminoácidos essenciais livres, os quais são utilizados para crescimento e desenvolvimento do inseto (Silva *et al.*, 2007, Pedra *et al.*, 2003, Silva *et al.*, 1999, Terra & Cristofoktti, 1996). Proteases digestivas, como as produzidas pelo caruncho *Zabrotes subfasciatus* podem degradar proteínas de defesa da planta como o inibidor da  $\alpha$ -amilase do feijão (Zhu-Salzmanet *et al.*, 2003).

As  $\alpha$ -amilases (E.C. 3.2.1.1.) são enzimas monoméricas que constituem uma família de endoamilases que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 do amido, glicogênio e outros carboidratos em pequenos oligossacarídeos que podem ser assimilados pelo organismo (Bonavides *et al.*, 2007, Franco *et al.*, 2005, Pedra *et al.*, 2003, Franco *et al.*, 2000, Iulek, *et al.*, 2000, Franco *et al.*, 1999). Várias espécies de insetos, incluindo pragas de grãos armazenados de importância econômica, vivem numa dieta rica em polissacarídeos, e dependem efetivamente das suas  $\alpha$ -amilases para sobrevivência (Mendiola *et al.*, 2000).

Em carunchos de feijão, níveis diferenciados das atividades das enzimas digestivas proteases e amilases sugerem uma maior eficiência metabólica. Portanto, o processo de resistência pode ser atribuído a uma melhor adaptação aos inibidores naturais presentes na planta levando ao sucesso reprodutivo e seleção dessas características.

Objetiva-se com este estudo avaliar as atividades enzimáticas específicas de serino e cisteíno-proteases e de  $\alpha$ -amilase de insetos adultos de *Acanthoscelides obtectus* em quatro populações, a fim de se detectar aquelas mais resistentes aos inibidores naturais presentes nas plantas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Populações de *Acanthoscelides obtectus*

Amostras de feijão comum, *Phaseolus vulgaris*, infestadas com *Acanthoscelides obtectus* foram obtidas diretamente de produtores rurais. Os insetos amostrados para o presente estudo foram provenientes de quatro localidades rurais com produção própria de sementes e baixa escala de produção (Figura 1).

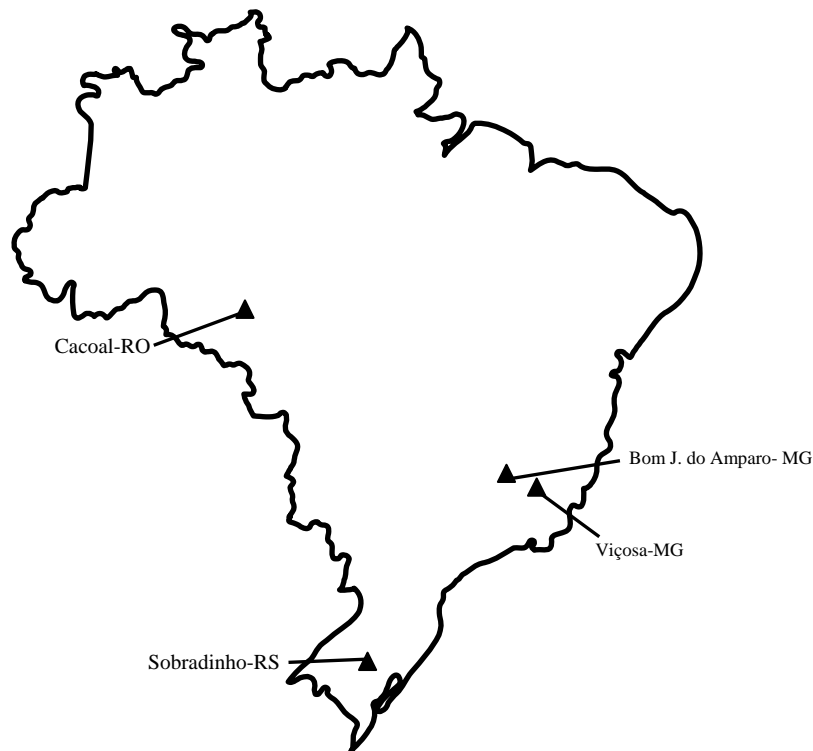


Figura 1- Mapa do Brasil representando as populações amostradas de *Acanthoscelides obtectus*.

Deliberadamente não foram amostrados insetos provenientes de produtores com grandes áreas de plantio. A escolha desta estratégia de coleta teve como objetivo maximizar as chances de amostrar insetos

provenientes de populações localmente adaptadas e que, potencialmente, poderiam estar sob menor influência de fluxo gênico associado a dispersões recentes, mediadas por atividades humanas. As amostras foram trazidas do campo para laboratório, onde foram mantidas individualizadas e em condições de multiplicação do inseto em sementes de um único genótipo de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Três populações (Viçosa-MG, Bom Jesus do Amparo-MG e Cacoal-RO) pertencem a uma linhagem filogeográfica de *A. obtectus* de maior amplitude geográfica no Brasil. Uma quarta população, Sobradinho-RS, pertence a uma linhagem filogeográfica distinta e que está restrita ao sul do país. As linhagens filogeográficas foram determinadas em estudo filogeográfico descritos no capítulo anterior. Este estudo foi conduzido com base em sequenciamento dos genes citocromo oxidase I e ribossomo 16S do DNA mitocondrial.

### **Obtenção dos extratos enzimáticos**

Para a análise da atividade de cisteíno-proteases e serino-proteases foram utilizadas três amostras aleatórias de 20 insetos adultos cada, não-sexados e congelados em nitrogênio líquido. Para obtenção dos extratos enzimáticos, os insetos foram triturados em solução tampão contendo Tris-HCl 0,1M, pH 8,0. O extrato bruto foi centrifugado por 15 minutos em 10.000 *g* e o sobrenadante utilizado para determinação da atividade de cisteíno e serino-proteases e determinação da concentração de proteínas, sendo o precipitado descartado. Para obtenção do extrato enzimático referente à análise da atividade da  $\alpha$ -amilase, foram utilizadas três amostras aleatórias de cinco insetos adultos não-sexados e congelados em nitrogênio líquido. As

amostras foram trituradas e posteriormente foram adicionados em 250  $\mu\text{L}$  de HCl  $10^{-3}$  M. O extrato bruto foi centrifugado por 15 minutos em 10.000  $g$  e o sobrenadante utilizado para as determinações da atividade da  $\alpha$ -amilase, sendo o precipitado descartado.

### **Determinação da concentração de proteínas**

A determinação da concentração de proteínas nos extratos enzimáticos foi realizada segundo o método de Warburg & Christian (1941), para determinação de atividade específica.

### **Determinação de atividade enzimática**

Para o ensaio da atividade de serino-proteases foi utilizado o método descrito por Erlanger (1961). Foi utilizado o substrato cromogênico L-BApNA (N- -Benzoil- L-Arginina- 4- para- nitroanilida; 60 mM) diluído em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 com  $\text{CaCl}_2$  20 mM. A reação contendo 200  $\mu\text{L}$  de substrato e 40  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foi incubada e as atividades iniciais foram determinadas pela formação do produto p-nitroanilina, em função do tempo, durante 2,5 minutos, à 25° C. Em seguida foi realizada a leitura da absorvância em espectrofotômetro com comprimento de onda 410 nm. Nos cálculos da atividade enzimática, utilizou-se coeficiente de extinção molar de  $8800\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

A atividade de cisteíno-proteases foi realizada utilizando-se o método descrito por Erlanger (1961), com adição de um inibidor para serino-protease (40  $\mu\text{L}$  de benzamidina na concentração final de 1 mM na mistura de reação) e DTT (ditiotreitól) na concentração 5mM. A determinação da atividade foi

realizada com leituras de absorvância a 410 nm, durante 2,5 minutos. Nos cálculos da atividade enzimática utilizou-se coeficiente de extinção molar de  $8800\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Para análise da atividade da enzima amilase foi utilizado o kit 003 da BIOCLIN (QUIBASA – Química Básica Ltda, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), contendo substrato e reagente de cor, sendo a reação baseada na cinética de tempo fixo (Caraway, 1959). Os ensaios foram realizados incubando-se 5  $\mu\text{L}$  de amostra enzimática com 250  $\mu\text{L}$  de substrato, amido ( $0,4\text{ g.L}^{-1}$  em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0) a  $37^\circ\text{C}$ . A reação foi paralisada após 7 minutos e meio, pela adição do reagente de cor (solução de iodo) e diluída em 2,0 mL de água destilada. A leitura foi feita em comprimento de onda de 620 nm.

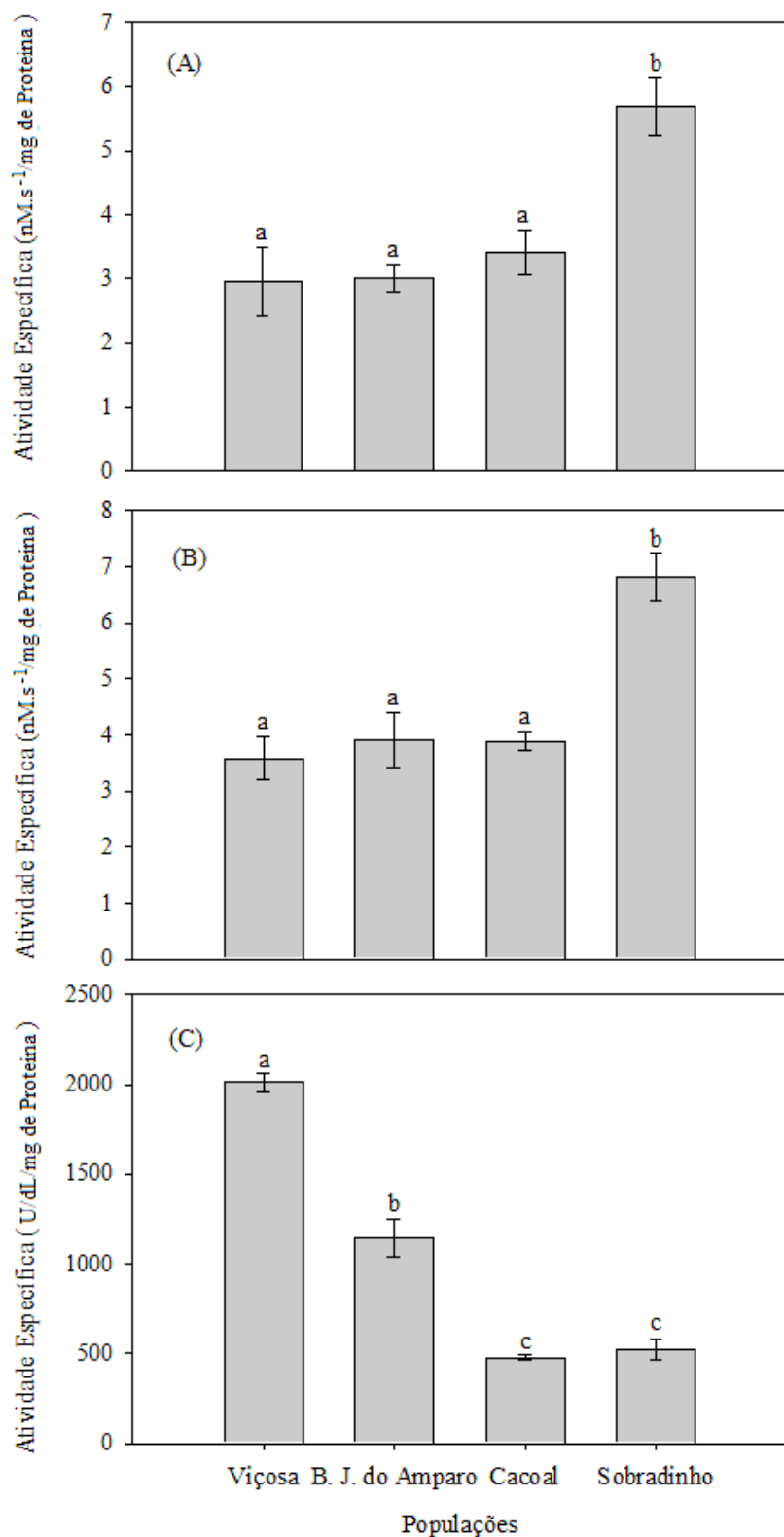
### **Análise estatística**

As observações referentes às atividades enzimáticas foram submetidas à análise de variância e foram aplicados teste de Tukey para comparação de médias entre as populações ( $p < 0,05$ ) após realizações de teste quanto à conformidade aos pressupostos de normalidade e homogeneidade da variância, utilizando-se o Sistema de Análise Estatística e Genética (SAEG, 2007).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias para as atividades das enzimas serino e cisteíno-proteases e  $\alpha$ -amilase das populações Viçosa, Bom Jesus do Amparo, Cacoal e Sobradinho estão apresentadas na Figura 1 (A e B). Observa-se que as atividades das enzimas proteolíticas serino e cisteíno-proteases de *A. obtectus* são significativamente maiores ( $P < 0,05$ ) na população Sobradinho em relação às demais populações, as quais não diferem entre si. Os maiores valores da atividade específica de cisteíno-protease, quando comparados à serino-proteases, esta de acordo com a literatura, uma vez que os bruquídeos utilizam predominantemente as enzimas cisteíno e aspartil-proteases e em menor magnitude as serino-proteases para digerir as proteínas dietéticas (Melo *et al.*, 2003, Pedra *et al.*, 2003).

Se analisados pela ótica da teoria da co-evolução, estes resultados apontam para uma trajetória evolutiva independente na população Sobradinho. A teoria da co-evolução sugere que a produção e o acúmulo das toxinas de uma planta são seguidos por uma resposta do parasito ou da praga que pode se revelar em desintoxicação, excreção de compostos de defesa, excreção da toxina ou maior produção de enzimas para suprir o aumento da demanda por nutrientes (Ridley, 2006, Kergoat *et al.*, 2005, Franco *et al.*, 2002).



**Figura 1-** Atividades específicas em quatro populações de *Acanthoscelides obtectus* para serino-protease (A) cisteino-protease (B) e  $\alpha$ -amilase (C). Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si ( $P>0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Por meio de processos evolutivos, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa natural contra o ataque de insetos fitófagos. Alguns destes mecanismos se baseiam na produção de compostos que podem ser aprotéicos como alcalóides, terpenos, antibióticos e glucosídeos cianogênicos ou protéicos como quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanase, arcelinas, lectinas, vicilinas, sisteminas e as enzimas inibidoras (Franco *et al.*, 2002).

A maior atividade das enzimas proteolíticas observada na população Sobradinho sugere que esta população evoluiu sob pressão de seleção distinta das demais populações analisadas, o que possivelmente conferiu maior adaptação frente aos inibidores de proteases presentes na planta hospedeira. Sobradinho também é uma população que pertence a uma linhagem filogeográfica restrita ao sul do Brasil, conforme observado no estudo filogeográfico apresentado no capítulo anterior.

Estudos adicionais com outras populações da mesma linhagem filogeográfica que Sobradinho são necessários para discernir se a maior atividade proteolítica das serino e cisteíno-proteases seria uma adaptação ecológica de Sobradinho ou se seria compartilhada com outras populações da linhagem.

Observa-se na figura 1(C), que a população Viçosa, seguida da população Bom Jesus do Amparo, apresentou maior atividade da enzima  $\alpha$ -amilase responsável pelo metabolismo energético. No entanto, as populações Sobradinho e Cacoal apresentaram menores níveis de atividade da amilase e os valores não diferem entre si. Este resultado sugere a existência de variações significativas na atividade de amilase na linhagem filogeográfica com maior amplitude geográfica no Brasil, o que pode estar

associado a diferenças na susceptibilidade do caruncho aos inibidores de amilase do feijão nesta linhagem. Vários autores descrevem a relação entre enzimas de alguns bruquídeos e respectivos inibidores enzimáticos produzidos pelo feijão, dando apoio à resistência da planta hospedeira contra *A. obtectus*. Grossi de Sá & Chrispeels (1997) e Ishimoto & Chrispeels (1996) observaram que o inibidor  $\alpha$ -AI1 é digerido por proteases de *Z. subfasciatus*, mas não apresenta tal atividade em *Callosobruchus maculatus* e *Callosobruchus chinensis*. Autores como, Bonavides *et al.*, (2007), Silva *et al.*, (2004), Silva *et al.* (2001), Mendiola *et al.* (2000) relataram em seus trabalhos que o inibidor  $\alpha$ -AI2 é resistente às enzimas de *C. chinensis* e *Z. subfasciatus*, inibindo a  $\alpha$ -amilase, sendo um fator de resistência. No entanto, para *A. obtectus* nenhum dos dois inibidores foram digeridos e também não inibiram a  $\alpha$ -amilase do inseto.

## **CONCLUSÕES**

As atividades específicas de serino e cisteíno-proteases em *Acanthoscelides obtectus* apresentam maiores valores na população Sobradinho, quando comparado com as populações Viçosa, Bom Jesus do Amparo e Cacoal.

A população Viçosa apresenta maior atividade de amilase, seguido pela população Bom Jesus do Amparo, enquanto que as populações Cacoal e Sobradinho mostraram atividade menor.

Estes resultados indicam diferenças entre as populações no tocante à adaptação e susceptibilidade do caruncho frente ao feijão comum e sugere que o metabolismo protéico ocorre mais eficientemente na população Sobradinho e associa-se ao fenômeno de resistência aos inibidores das enzimas proteolíticas.

## **Agradecimentos**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro concedido a Luiz Orlando de Oliveira, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas de estudos de pós-graduação a Márcia Rodrigues Carvalho.

## REFERÊNCIAS

- Araújo, R S, Rava, CA, Stone, LF & Zimmermann, M. J. de O (1996). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**, Piracicaba: POTAFOS, 786 p.
- Boiça, Jr. AL, Botelho ACG & Toscano, LC (2002). Comportamento de genótipos do feijoeiro ao ataque de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman 1833) (Coleoptera: Bruchidae) em condições de laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico (São Paulo)**, 69(2):51-55.
- Bonavides, KB, Pelegrini, PB, Laumann, RA *et al.* (2007). Molecular identification of four different  $\alpha$ -amylase inhibitors from baru (*Dipteryx alata*) Seeds with activity toward insect enzymes. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, 40(4) July: 494-500.
- Caraway, W.T. (1959). A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. **American Journal of Clinical Pathology**, 32:97-99.
- Erlanger BF, Kokowsky N & Cohen W (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 95:271-278.
- Franco, OL, Melo, FR, Mendes, PA *et al.* (2005). Characterization of Two *Acanthoscelides obtectus*  $\alpha$ -amylases and their inactivation by wheat inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53:1585-1590.
- Franco, OL, Melo FR, Silva MCM *et al.* (1999). Resistência de plantas a insetos: Inibidores de enzimas digestivas e a obtenção de plantas resistentes. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 2:36-40.
- Franco, OL, Rigden DJ, Melo FR & Grossi-de-Sá MF (2002). Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases. Structure,

function and potential for crop protection. **European Journal of Biochemistry**, 269:397-412.

Franco OL, Rigden DJ, Melo FR *et al.* (2000). Activity of wheat  $\alpha$ -amylase inhibitors towards bruchid  $\alpha$ -amylases and structural explanation of observed specificities. **European Journal of Biochemistry**, 267:2166-2173.

Gonzales-Rodríguez, A, Benrey, B, Callejas, A & Oyama, K (2002). Inter and intraspecific genetic variation and differentiation in the sibling bean weevils *Zabrotes subfasciatus* and *Z. sylvestris* (Coleoptera: Bruchidae) from Mexico. **Bulletin of Entomological Research**, 92:185-189.

Grossi de Sá, MF & Chrispeels, MJ (1997). Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*)  $\alpha$ -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 27(4):271-281.

Iulek, J, Franco OL, Silva M *et al.* (2000). Purification, biochemical characterization and partial primary structure of a new  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye). **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 32 1195–1204.

Ishimoto M & Chrispeels MJ (1996). Protective mechanism of the mexican bean weevil against high level of  $\alpha$ -amylase inhibitor in the common bean. **Plant Physiology**, 111:393-401.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2008. Levantamento sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_200808\\_5.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200808_5.shtm). Acesso dia 03 de outubro de 2008.

- Kergoat, GJ, Alvarez, N, Hossaert-Mckey, M *et al.* (2005). Parallels in the evolution of the two largest New and Old World seed-beetle genera (Coleoptera, Bruchidae). **Molecular Ecology**, 14:4003-4021.
- Mazzonetto F & Vendramim JD (2002). Aspectos biológicos de *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera:Bruchidae) em genótipos de feijoeiro com e sem arcelina. **Neotropical Entomology**, 31(3) July – September: 435-439.
- Mello, MO & Silva-Filho M (2002). Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal Plant Physiology**, 14(2): 71-81.
- Melo FR, Mello MO, Franco OL *et al.* (2003). Use of phage display to select novel cystatins specific for *Acanthoscelides obtectus* cysteine proteinases. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1651:146– 152.
- Mendiola-OE, Valencia-JÁ, Valde's-RS *et al.* (2000). Digestive amylase from the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* Horn. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, 126:425–433.
- Moda-Cirino, V (2006). Desafios ao controle de pragas na cultura do feijoeiro: desafios na região sul. Disponível em:<[http://www.infobibos.com/Artigos/2006\\_2/DesafiosSul/Index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/DesafiosSul/Index.htm)>. Acessado dia: 06 de agosto de 2008.
- Pedra, JHF, Brandi, A, Westerman, R *et al.* (2003). Transcriptome analysis of the cowpea weevil bruchid: Identification of putative proteinases and  $\alpha$ -amylases associated with food breakdown. **Insect Molecular Biology**, 12(4):405-412.
- Ridley, M (2006). **Evolução**, 3rd ed., Porto Alegre, Ed. Artmed. 752p.

SAEG Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

Silva, FB, Monteiro, ACS, Del Sarto, RP *et al.* (2007). Proregion of *Acanthoscelides obtectus* cysteine proteinase: A novel peptide with enhanced selectivity toward endogenous enzymes. **Peptides**, 28:1292-1298.

Silva CP, Terra WR & Grossi de Sá, MF (2001). Induction of digestive  $\alpha$ -amylases in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean  $\alpha$ -amylase inhibitor 1. **Journal of Insect Physiology**, 47:1283–1290.

Silva CP, Terra WR, Xavier-Filho Jr. *et al.* (1999). Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on  $\alpha$ -amylases and oligosaccharidases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 29: 355–366.

Silva, MCM, Mello LV, Coutinho MV *et al.* (2004). Mutants of common bean alpha-amylase inhibitor-2 as an approach to investigate binding specificity to alpha-amylases. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 39(3):201-208.

Terra WR & Cristofoktti HT (1996). Midgut Proteinases in Three Divergent Species of Coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 113 part B, (4):725-730.

Warburg, O, Christian, W (1941). Isohierung und kristallisation des garungsfermentes enolase. **Biochemische Zeitschrift**, 310: 384-421.

Zhu-Salzman, K, Koiwa, H, Salzman RA. *et al.* (2003). Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. **Insect Molecular Biology**, 12(2):135–145.

## **ANEXOS**

**Tabela 1-** Sequências de *Acanthoscelides obtectus* obtidas no GenBank, com seus respectivos locais amostrados, número de acesso e códigos, para o gene COI.

COI		
Local	Nº acesso Genbank	Código
México	AY676638	TEP #1
	AY676639	TEP #2
	AY881198	TEP #3
	AY881200	XOT
	AY826493	XOT #3
	AY676626	MAL #
	AY676627	MAL #2
	AY676628	OCU #1
	AY676629	OCU #2
	AY676634	SJC #1
	AY676635	SJC #2
	AY881196	SJC #3
	AY676630	SAG #1
	AY676631	SAG #2
	AY826492	MEXICO_SAG_5
	AY676636	SPT #1
	AY676637	SPT #2
	AY881201	SPT #3
	AY676644	YAU #1
	AY676645	YAU #2
	AY826487	MEXICO_SCA
	AY676640	TLA #1
	AY676641	TLA #2
	AY881197	TLA #3
	AY826488	MEXICO_TLA_1
	AY826494	MEXICO_STO

	AY676633	SJS #2
	AY881199	SJS #3
	AY826496	MEXICO_SJS_2
	AY676646	MEXICO YOH1
	AY676647	YOH #2
	AY826486	MEXICO_YOH
	AY826495	MEXICO_COE_2
	AY826489	MEXICO SFP
<hr/>		
Peru		
	AY826503	PERU_2
	AY826498	PERU_6
	AY826499	PERU_8
	AY826490	PERU_12
	AY826500	PERU_13
	AY826501	PERU_15
	AY826504	PERU_16
	AY826502	PERU_19
	AY826497	PERU_23
	AY826505	PERU_29
<hr/>		
Espanha		
	AY826485	SPAIN_PRA_1
<hr/>		
França		
	AY826491	FRANCE_CHA_5
<hr/>		
Suíça		
	AY676624	Switzerland #2
	AY676625	Switzerland #1
	AY826485	Switzerland
<hr/>		
Camarões		
	AY676622	Cameroon #1
	AY676623	Cameroon #2
	AY826483	CAMEROON_YAH

**Tabela 2-** Sequências de *Acanthoscelides obtectus* obtidas no GenBank, com seus respectivos locais amostrados, número de acesso e códigos, para o gene COI.

<b>rRNA16S</b>		
<b>Local</b>	<b>Nº acesso Genbank</b>	<b>Código</b>
México	AY826462	MEXICOSCA
	AY826468	MEXICO_XOT_3
	AY826467	MEXICO_SAG_5
	AY826463	MEXICO_TLA_1
	AY826469	MEXICO_STO
	AY826471	MEXICO_SJS_2
	AY826461	MEXICO_YOH
	AY826470	MEXICO_COE_2
	AY826464	MEXICO SFP
Peru	AY826478	PERU_2
	AY826473	PERU_6
	AY826474	PERU_8
	AY826465	PERU_12
	AY826475	PERU_13
	AY826476	PERU_15
	AY826479	PERU_16
	AY826477	PERU_19
	AY826472	PERU_23
	AY826480	PERU_29
Espanha	AY826460	SPAIN_PRA_1
França	AY826466	FRANCE_CHA_5
Suíça	AY826459	SWITZERLAND_NEU_1
Camarões	AY826458	CAMEROON_YAH