

GISELLE ANSELMO DE SOUZA

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Zabrotes subfasciatus* Boheman  
(COLEOPTERA: BRUCHIDAE) AVALIADA COM MARCADORES  
*ISSR*

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós Graduação em  
Genética e Melhoramento, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S729d  
2007

Souza, Giselle Anselmo de, 1980-

Diversidade genética de *Zabrotes subfasciatus*  
Boheman (coleóptera: Bruchidae) avaliada com  
marcadores ISSR / Giselle Anselmo de Souza. – Viçosa,  
MG , 2007.

x, 42f. : il. (algumas col.); 29cm.

Orientador: Luiz Orlando de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 34-42.

1. Caruncho - Genética. 2. Caruncho - Populações.  
3. Caruncho - Distribuição geográfica. 4. *Zabrotes*  
*subfasciatus*. 5. Feijão - Armazenamento - Doenças e  
pragas. 6. Marcadores genéticos. I. Universidade Federal  
de Viçosa. II.Título.

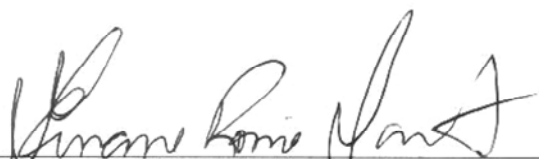
CDD 22.ed. 632.764

GISELLE ANSELMO DE SOUZA

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Zabrotes subfasciatus* Boheman  
(COLEOPTERA: BRUCHIDAE) AVALIADA COM MARCADORES  
ISSR

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós Graduação em  
Genética e Melhoramento, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2007.



---

Prof. Ernane Ronie Martins

(Co-orientador)



---

Prof. Jorge Abdala Dergam dos Santos



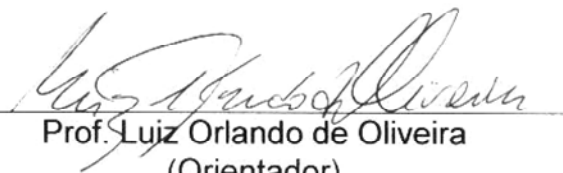
---

Profª: Tânia Maria Fernandes Salomão



---

Dr. Rogério Faria Vieira



---

Prof. Luiz Orlando de Oliveira  
(Orientador)

*Aos meus pais, Juvenal e Conceição.*

*Às minhas irmãs, Danielle e Gracielle.*

*Ao Wagner.*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por ter me dado forças para superar as dificuldades e ter conseguido alcançar essa vitória.

À minha família, em especial aos meus pais, Juvenal e Conceição, e minhas irmãs, Danielle e Gracielle, e à Júlia, pelo constante incentivo, amor e dedicação e por sempre apoiarem as minhas decisões.

Ao Wagner, pelo companheirismo, cumplicidade, dedicação e paciência.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento por ter permitido a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Luiz Orlando de Oliveira, pela oportunidade de orientação.

Ao Professor Raul Narciso Carvalho Guedes pelas sugestões dadas no trabalho.

Ao Ernane Ronie Martins, exemplo de profissionalismo e dedicação, por ter me ensinado os primeiros passos na pesquisa científica.

Às colegas do Laboratório de Seqüenciamento de DNA: Beatriz, Andréia, Cassiana, Daniela, Francismar, Pricila, Larissa, Lílian, Mariana, Viviane, Polyana, Maria Andréia pelo apoio, incentivo e amizade.

Ao nosso grupo de discussão Ana, Roberta, Bruna, Magali, Talles, Márcia, Maíra, Fernanda, Celice, pela troca de experiências, pela convivência e pelas sugestões para o trabalho.

À Márcia Rodrigues e Ana Rossi pela grande amizade, que ajudou a suportar a ausência da família, pelos conselhos e palavras de incentivo, e ajuda na realização do trabalho.

Ao Luiz Alberto Pessoni, pelas sugestões dadas no trabalho, pela presteza e amizade.

Aos produtores rurais que gentilmente cederam as amostras de feijão infestados por carunchos para a realização deste trabalho.

Às colegas de república, Otavia, Fernanda, Roseli, que sempre entenderam os vários momentos de reclusão.

Aos professores das disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pelos ensinamentos.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento e do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO).

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular I (Biomol) e a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

GISELLE ANSELMO DE SOUZA, filha de Juvenal de Souza Filho e Maria da Conceição Anselmo de Souza, nasceu em 11 de agosto de 1980, em Montes Claros-MG.

Em dezembro de 1998 concluiu o ensino médio na Escola Estadual Professor Plínio Ribeiro, em Montes Claros, MG.

Em 2000, iniciou o curso de graduação em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Minas Gerais, onde desenvolveu diversas atividades de pesquisa, ensino e extensão como bolsista do Programa de Aprimoramento Discente e do Programa Especial de Treinamento, colando grau em janeiro de 2005.

Ingressou no curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento em nível de Mestrado, em março de 2005, pela Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se a defesa de tese em fevereiro de 2007.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
3.1- Feijão: origem, domesticação e importância econômica.....	4
3.2- <i>Zabrotes subfasciatus</i> .....	5
3.3- Marcadores moleculares .....	10
3.4- Marcadores Moleculares <i>ISSR</i> .....	11
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
4.1- Obtenção de insetos .....	13
4.2- Extração de DNA .....	15
4.3- Escolha e amplificação dos <i>primers ISSR</i> .....	16
4.4- Análise de dados.....	17
<b>5- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>19</b>
5.1- Diversidade genética dentro de populações .....	19
5.2- Diversidade genética entre populações e análise de agrupamento ..	22
<b>6- CONCLUSÕES .....</b>	<b>33</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>34</b>

## RESUMO

SOUZA, Giselle Anselmo de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2007. **Diversidade genética de *Zabrotes subfasciatus* Boheman (Coleoptera: Bruchidae) avaliada com marcadores *ISSR*.** Orientador: Luiz Orlando de Oliveira. Co-Orientadores: Ernane Ronie Martins e Raul Narciso Carvalho Guedes.

*Zabrotes subfasciatus* Boheman (Coleoptera: Bruchidae), espécie originária provavelmente na América Central, se tornou uma praga agrícola quando se estabeleceu e passou a se reproduzir continuamente em sementes armazenadas, difundindo-se posteriormente pelas regiões tropicais e subtropicais. Em armazéns, esses insetos causam danos aos grãos, perfurando-os e conferindo-lhes sabor desagradável, depreciando o seu valor comercial. Nas sementes, a praga consome as reservas dos cotilédones, comprometendo a germinação. O objetivo deste trabalho foi estimar a diversidade genética de populações de *Z. subfasciatus* por meio de marcadores moleculares *ISSR* (*Inter Simple Sequence Repeat*). Foram avaliadas 12 populações de *Z. subfasciatus*, amostradas em oito estados brasileiros, totalizando 269 indivíduos. Cinco *primers* *ISSR* foram utilizados (UBC 807, UBC 808, UBC 809, UBC 811, UBC 891), sendo amplificadas um total de 51 bandas polimórficas com média de 10 bandas por *primer*. A porcentagem de polimorfismo dentro de cada população variou de 74,51 a 92,16, com porcentagem média de 83,82. A heterozigosidade esperada corrigida de Nei ( $H_E$ ), variou de 0,2253 a 0,3281, com média de 0,2885 e o índice de diversidade genética de Shannon e Weaver ( $I$ ) variou de 0,2908 a 0,4805, com média de 0,4167. Em nível de espécie, estes dois índices apresentaram valores de 0,3636 e 0,5393 respectivamente. Os valores de  $F_{ST}$  entre pares de populações obtidos pela análise de variância molecular (AMOVA) variaram de 0,06804 a 0,6165. A distância genética de Nei (1978), usada para estimar a divergência genética entre populações, variou de 0,0563 a 0,3250. A AMOVA permitiu uma partição da variação genética em dois níveis: dentro de populações e entre populações. Foi observada maior variação genética dentro da população, com 66% da variação total. Apenas 34% da variação genética foi observada entre populações. O teste de Mantel revelou baixa correlação entre distância

geográfica e  $F_{ST}$ , identidade genética e  $F_{ST}$  e entre distância genética de Nei e  $F_{ST}$ . Pode-se concluir que a variabilidade genética da espécie ainda é considerada baixa no Brasil, provavelmente devido à introdução recente da praga. As populações de *Zabrotes subfasciatus* avaliadas não se apresentam geograficamente estruturadas no Brasil.

## ABSTRACT

SOUZA, Giselle Anselmo de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2007. **Genetic diversity of *Zabrotes subfasciatus* Boheman (Coleoptera: Bruchidae) evaluated by using ISSR markers.** Adviser: Luiz Orlando de Oliveira. Co-advisers: Ernane Ronie Martins and Raul Narciso Carvalho Guedes.

The *Zabrotes subfasciatus* Boheman (Coleoptera: Bruchidae) is a species probably originated from Central America. It became an agricultural pest since it was established and continually began to reproduce in stored seeds and later diffused throughout tropical and subtropical regions. In stores, those insects cause damages to the grains, by boring them and giving them an unpleasant flavor, therefore depreciating their commercial value. In seeds, the pest consumes the reserves of the cotyledons, therefore endangering germination. This study was conducted to estimate the genetic diversity in *Z. subfasciatus* populations, by using the molecular markers ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). Twelve populations of *Z. subfasciatus* amostras were sampled in eight Brazilian states as totaling 269 individuals, then they were evaluate. Five primers ISSR (UBC 807, UBC 808, UBC 809, UBC 811, UBC 891) were used, whereas a total of 51 polymorphic bands averaging 10 bands by each primer were amplified. The percent polymorphism within each population ranged from 74.51 to 92.16, with an average percentage of 83.82. The expected heterozygosity corrected by Nei in 1978 ranged from 0.2253 to 0.3281 with some 0.2885 average, whereas the genetic diversity index by Shannon and Weaver ( $H_E$ ) ranged from 0.2908 to 0.4805, as averaging 0.4167. At species level, those two indexes showed the values 0.3636 and 0.5393 respectively. The  $F_{ST}$  values between the population pairs obtained by molecular variance analysis (AMOVA) ranged from 0.06804 to 0.6165. The genetic distance by Nei used in estimation of the genetic divergence among populations ranged from 0.0563 to 0.3250. The AMOVA allowed for the partition of the genetic variation into two levels: either inside and among populations. Higher genetic variation was observed inside population, with 66% of the total variation. Only 34% genetic variation were observed among populations. The Mantel test showed low correlation between geographical distance and  $F_{ST}$ , genetic identity and  $F_{ST}$ , and

between the Nei genetic distance and  $F_{ST}$ . According to the results, the following conclusions were drawn: the genetic variability of the species is still considered as low in Brazil, probably due to the recent introduction of the pest; and those *Zabrotes subfasciatus* populations showed to be not geographically structured in Brazil.

## 1. INTRODUÇÃO

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) representa um importante componente da dieta da população brasileira por ser uma excelente fonte de proteína, de carboidratos e minerais.

O Brasil se destaca em âmbito mundial como o maior produtor de feijão, entretanto, a cultura ainda apresenta baixa produtividade quando comparada à de outros países. Esse baixo rendimento deve-se principalmente à baixa tecnologia empregada no seu cultivo e à fitossanidade, tanto durante o ciclo de cultivo quanto durante o armazenamento. Estima-se que apenas as pragas que atacam os grãos armazenados sejam responsáveis por 20-30% de perdas na produção brasileira. Dentre essas pragas destaca-se *Zabrotes subfasciatus*, espécie provavelmente originária da América Central. A espécie se tornou uma praga agrícola quando se estabeleceu e passou a se reproduzir continuamente em sementes armazenadas. Difundiu-se posteriormente pelas regiões tropicais e subtropicais, por meio do comércio de sementes e, atualmente, é cosmopolita, e particularmente importante nas Américas Central e do Sul e também se apresenta amplamente distribuída na África, Índia e Região Mediterrânea (MAGALHÃES e CARVALHO, 1988; HILL, 1990; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2002; AEBI *et al.*, 2004)

Os adultos possuem a capacidade de reproduzirem no campo, durante a formação das sementes, e em grãos armazenados. Os insetos perfuram os grãos, conferindo-lhes sabor desagradável, e reduzindo o seu valor comercial. Além disso, também consomem as reservas dos cotilédones e comprometem a germinação e vigor das sementes (PIMBERT e PIERRE, 1983; HILL, 1990, ABATE e AMPOFO 1996; YOKOYAMA, 2006).

Pereira *et al.* (1995), Mazzoneto (2002), Sales *et al.* (2005) relatam a interação bioquímica e molecular de *Z. subfasciatus* e seus hospedeiros, no entanto, pouco se sabe sobre a extensão da subdivisão genética entre populações dessa espécie. Os marcadores moleculares podem ser utilizados como uma importante ferramenta para estudos de diversidade

genética entre indivíduos, dentro e entre espécies relacionadas ou populações.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi analisar a estrutura genética de populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus* com marcadores moleculares *ISSR* (*Inter Simple Sequence Repeat*).

Os objetivos específicos foram:

- Validar e estabelecer metodologias aplicáveis ao estudo da distribuição da diversidade genética de *Z. subfasciatus*;
- Estimar a variabilidade genética dentro e entre populações brasileiras de *Z. subfasciatus*;
- Quantificar a variação genética dentro e entre populações de *Z. subfasciatus* e como esta variação está distribuída geograficamente;
- Correlacionar a variabilidade genética e distribuição geográfica de *Z. subfasciatus*.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1- Feijão: origem, domesticação e importância econômica

O gênero *Phaseolus* (Fabaceae) compreende aproximadamente 55 espécies, das quais quatro são cultivadas, o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*); o feijão-de-lima (*P. lunatus*); o feijão-ayocote (*P. coccineus*) e o feijão-tepari (*P. acutifolius*), todas derivadas de um mesmo ancestral comum. O feijão-comum é o mais amplamente distribuído e utilizado (ZIMMERMAN e TEIXEIRA, 1988; EMBRAPA, 2005).

A domesticação do gênero *Phaseolus* e a ação das forças evolutivas (mutação, seleção, migração, e deriva genética) resultaram em alterações na morfologia, fisiologia e nas características genéticas da espécie, produzindo plantas de hábitos de crescimento mais compacto e ereto, gigantismo das partes vegetativas; aumento no tamanho de vagens e sementes; redução da sensibilidade ao fotoperíodo, à dormência das sementes e à deiscência das vagens (ZIMMERMAN e TEIXEIRA, 1988; GEPTS e DEBOUCK, 1991).

Gepts e Debouck (1991) descrevem dois principais centros primários de domesticação do feijão baseado em padrões eletroforéticos de faseolina, principal proteína de reserva em grãos de feijão. O primeiro centro de domesticação seria a Mesoamérica e, de onde teria domesticado os cultivares que apresentam faseolina do tipo S, e que são, em geral os feijões de sementes menores. O segundo centro de domesticação seria os Andes, de onde teria sido domesticado os cultivares que apresentam faseolina do tipo "T", e possivelmente as faseolinas "A", "C" e "H", e que são, em geral, os feijões de sementes maiores.

No Brasil, o feijão representa um importante componente da dieta da população por ser excelente fonte protéica rica no aminoácido essencial lisina. Além disso, o feijão é rico em carboidratos, vitaminas, minerais, fibras e compostos fenólicos com ação antioxidante. A cultura do feijoeiro também se destaca pela importância socioeconômica em razão da mão-de-obra

empregada durante o ciclo da cultura. Estima-se que no cultivo do feijão sejam utilizados sete milhões de homens/dia-ciclo de produção (ABREU, 2005; BORÉM e CARNEIRO, 2006).

Em âmbito mundial, o Brasil se destaca como grande consumidor de feijão, com um consumo *per capita* de 16 kg/ano, e o maior produtor (ABREU, 2005; BORÉM e CARNEIRO, 2006), sendo estimada uma produção de 2,1 milhões de toneladas para a safra 2007 (IBGE, 2006).

Tradicionalmente, os pequenos agricultores têm sido os principais responsáveis pela produção do feijão, sendo aplicada pouca tecnologia na cultura. Conseqüentemente, a produtividade média da cultura ainda é baixa, 700 kg/ha. Fatores como cultivo em consórcio, efeitos climáticos e fitossanidade contribuem para essa baixa produtividade (ROSOLEM e MARUBAYASHI, 1994; BORÉM e CARNEIRO, 2006).

Estima-se que a incidência de pragas e doenças contribua para redução de rendimentos entre 33% e 86%, dependendo da espécie da praga, da cultivar utilizada, da época de semeadura e região de cultivo (MAGALHÃES e CARVALHO, 1988; ABREU, 2005; BORÉM e CARNEIRO, 2006). Apenas os insetos de armazenamento são responsáveis por cerca de 20 a 30% de perdas na produção brasileira (MAGALHÃES e CARVALHO, 1988).

### 3.2- *Zabrotes subfasciatus*

A ordem Coleoptera apresenta cerca de 300.000 espécies descritas muitas das quais são consideradas pragas agrícolas. Segundo Rees (1996), a maioria das espécies de importância econômica, como as que atacam grãos armazenados, é representada por sete famílias: Bostrichidae, Bruchidae, Cucujidae, Curculionidae, Dermestidae, Silvanidae e Tenebrionidae.

A família Bruchidae ocorre em todos os continentes, exceto na Antártida. Atualmente estão descritas mais de 1500 espécies distribuídas em 58 gêneros e, significativa porcentagem dessas espécies, é especializada em plantas economicamente importantes (SHELLIE-DESSERT e BLISS, 1991; ALVAREZ *et al.*, 2005).

Cerca de 20 espécies de bruquídeos desenvolvem-se em grãos de leguminosas armazenados e consumidos pelo homem (SOUTHGATE, 1979). Segundo Pedra *et al.* (2003), os carunchos de feijão (*Zabrotes subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus*) e o caruncho do caupi (*Callosobruchus maculatus*) são as mais importantes pragas de grãos armazenados da família Bruchidae.

*Zabrotes subfasciatus* Boheman originou-se provavelmente na América Central e utilizou os ancestrais selvagens das formas cultivadas de *Phaseolus vulgaris* e *Phaseolus lunatus* como hospedeiros. A espécie é particularmente importante nas Américas Central e do Sul, mas atualmente apresenta-se amplamente distribuída nos trópicos, especialmente na África, Índia e Região Mediterrânea. Embora a espécie prefira feijões do gênero *Phaseolus*, *Z. subfasciatus* também coloniza outras espécies da família Fabaceae de importância econômica, como os feijões do gênero *Vigna* (*V. subterranea*, *V. radiata* e *V. unguiculata*) e *Vicia* (HILL, 1990; PACHECO e CESAR DE PAULA, 1995; SALES *et al.*, 2005). A espécie tornou-se praga agrícola quando se estabeleceu e passou a se reproduzir continuamente em sementes armazenadas, difundindo-se posteriormente pelas regiões tropicais e subtropicais, por meio do comércio de sementes, ganhando assim *status* de praga cosmopolita (GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2002; AEBI *et al.*, 2004).

O besouro adulto mede de 1,8 a 2,5 mm de comprimento, apresenta cor castanho escura e os élitros, quando em repouso, deixam à mostra o pigídeo, último segmento abdominal. Os adultos apresentam dimorfismo sexual. As fêmeas são maiores que os machos e apresentam quatro manchas de cor creme nos élitros, contrastando com a cor escura brilhante do corpo. Os machos são inteiramente pardos e menores (GALLO *et al.*, 1988; YOKOYAMA, 1998) (Figura 1 e 2). Uma fêmea coloca, em média, 22 ovos e vive por 11 dias (YOKOYAMA, 1998), e para efetuar a postura, necessitam do contato direto com a semente, para estimular a ovogênese. Antes da oviposição, a fêmea expele um líquido claro e pegajoso. O ovo é colocado nesse meio, para aderi-lo ao tegumento do grão e servir de apoio para a penetração da larva no seu interior (PIMBERT e PIERRE, 1983; GALLO *et al.*, 1988; ABATE e AMPOFO, 1996). Após a eclosão dos ovos, o

primeiro instar larval penetra na semente e forma uma câmara onde permanecerá alimentando-se dos cotilédones até a pupação. A larva passa por quatro instares antes da pupação. No último instar, a larva abre um opérculo no grão, que servirá de saída para o adulto e se torna visível externamente à medida que o inseto se desenvolve. O acasalamento ocorre logo após a emergência do inseto adulto, e o período de maior oviposição das fêmeas compreende do 3º ao 4º dia após a emergência e acasalamento (GALLO *et al.*, 1988, KORNEGAY e CARDONA, 1991; ABATE e AMPOFO, 1996, SARI *et al.*, 2003).

A espécie prefere regiões de clima mais quente, por isso ocorre com maior frequência nas regiões tropical e subtropical (ABATE e AMPOFO, 1996). Segundo Hill (1990), 32 °C e 70% de umidade relativa do ar são as condições ideais para o desenvolvimento da espécie, com uma temperatura limite de 38 °C. O ciclo de vida completo da espécie é de 24 ou 25 dias, a longevidade dos insetos adultos é de aproximadamente 11 dias. *Z. subfasciatus* possui a capacidade de se reproduzir no campo, durante a formação das sementes, e em grãos armazenados. Apenas as larvas causam danos aos grãos armazenados uma vez que os insetos adultos não se alimentam (PIMBERT e PIERRE, 1983; HILL, 1990, ABATE e AMPOFO, 1996; YOKOYAMA, 2006).

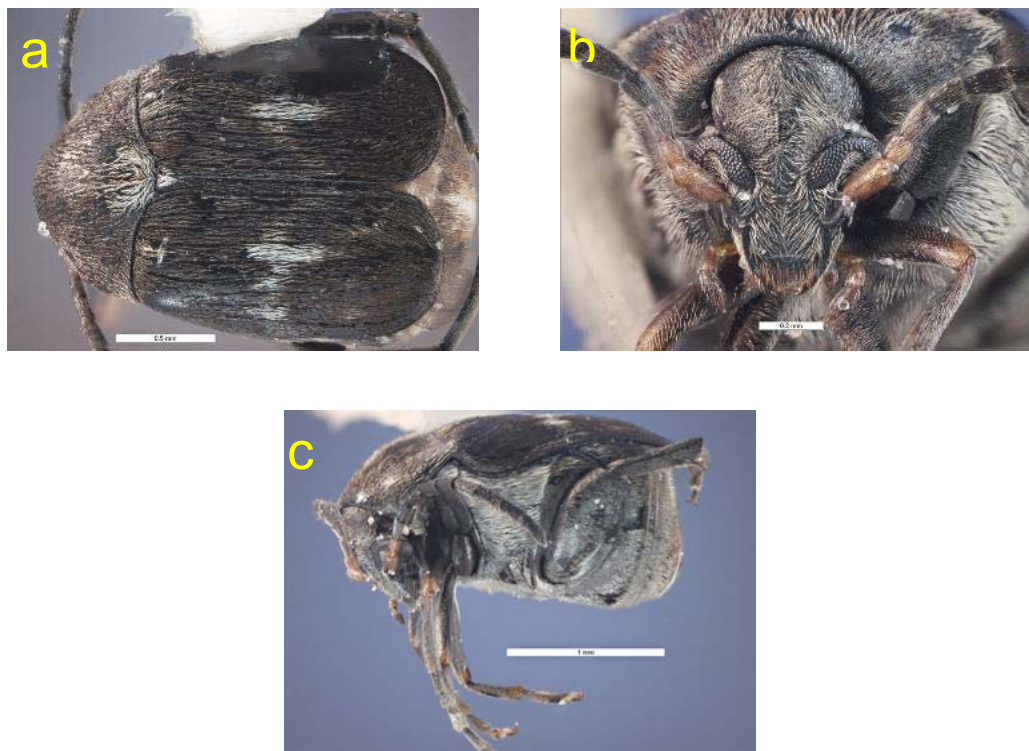
No Brasil, o caruncho do feijão ocorre em todas as regiões de cultivo do feijoeiro. Em armazéns, causa danos aos grãos, perfurando-os e conferindo-lhes sabor desagradável, reduzindo o seu valor comercial. Nas sementes, a praga consome as reservas dos cotilédones, comprometendo a sua germinação, resultando em plântulas debilitadas (VIEIRA, 1983; GALLO *et al.*, 1988). As perdas de grãos causadas por esse inseto chegam a 35% no México, América Central e Panamá e ficam em torno de 7% a 15% no Brasil (SCHOONHOVEN e CARDONA, 1982).

Kumar *et al.* (2001) afirmam que estratégias para o controle efetivo de pragas requerem um entendimento da variação genética dentro e entre populações da praga e de como esta variação está distribuída geograficamente.

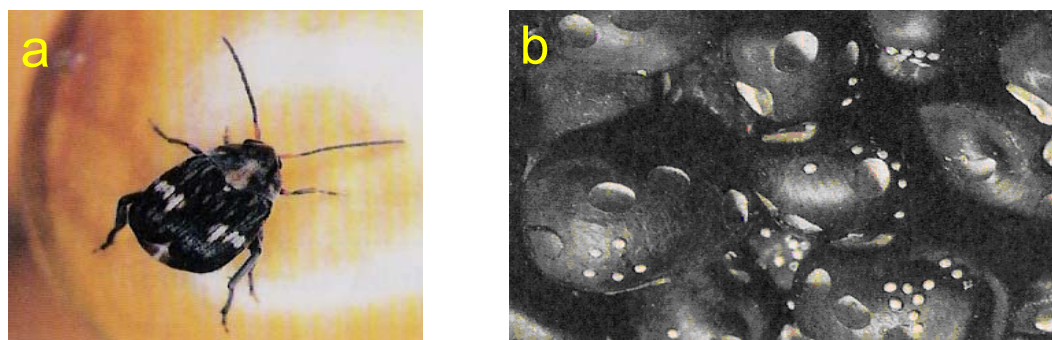
Há muitos trabalhos sobre a interação bioquímica e molecular desse inseto com seus hospedeiros como os publicados por Pereira *et al.* (1995),

Mazzoneto (2002) e Sales *et al.* (2005), no entanto, pouco se sabe sobre a extensão da subdivisão genética entre suas populações (GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2002). González-Rodríguez *et al.* (2002) afirmam que dados sobre a variabilidade genética da espécie são relevantes, pois restrições no fluxo gênico entre populações apresentam um papel importante na evolução da adaptação local, incluindo desenvolvimento de resistência a inseticidas e estabelecimento de raças hospedeiras. Em estudo realizado por esses autores, em cinco populações de *Z. subfasciatus*, com marcadores isoenzimáticos, foi detectada grande diferenciação genética entre as populações. Entretanto, os autores justificam que somente três dos seis locos analisados foram polimórficos, o que pode ter influenciado os resultados.

Aebi *et al.* (2004) testaram o grau de polimorfismo em seis locos microssatélites em fêmeas de duas populações de *Z. subfasciatus*. Todos os locos foram polimórficos com dois alelos por população e a heterozigosidade observada variou de 0,00 a 0,70. Segundo esses autores, os seis marcadores polimórficos possibilitam a estimativa da diversidade genética destes locos entre e dentro de populações da espécie, dessa forma, pode-se obter uma descrição detalhada da estrutura da população de *Z. subfasciatus* em relação à variabilidade genética da planta hospedeira e *status* de domesticação do feijão.



**FIGURA 1.** *Zabrotes subfasciatus*: a- vista dorsal; b- vista frontal; c- vista lateral. (Fonte: Padil, 2006)



**FIGURA 2.** a- *Zabrotes subfasciatus* sobre grão de feijão; b- Grãos de *Phaseolus vulgaris* infestados por ovos de *Z. subfasciatus*. (Fonte: Gallo *et al.*, 2002).

### 3.3-Marcadores moleculares

Os marcadores genéticos são definidos como elementos capazes de prever, mapear e caracterizar um fenótipo. Entre as décadas de 20 e 60, os marcadores morfológicos e os marcadores isoenzimáticos, foram os primeiros marcadores genéticos utilizados para auxiliar estudos de genética de populações. Entretanto, esses marcadores eram limitados a espécies que apresentavam uma maior disponibilidade de informações genéticas, como por exemplo, tomate (*Solanum lycopersicum*) (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Com o advento das técnicas de biologia molecular na década 80, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente no nível de DNA, denominados marcadores de DNA ou marcadores moleculares. Os primeiros marcadores utilizados foram aqueles baseados em enzimas de restrição, como os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Posteriormente, com o desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), surgiram outras classes de marcadores moleculares (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998), como os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), minisatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*), SSR (*Simple Sequence Repeat*), dentre outros (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998).

Os diversos tipos de marcadores moleculares atualmente disponíveis diferenciam-se pela abundância no genoma, nível de polimorfismo detectado, especificidade dos locos, reprodutibilidade, natureza da herança e requerimentos técnicos para aplicação do marcador. Marcadores moleculares de origem nuclear são muito úteis para revelar a história da colonização e a estrutura das populações modernas de uma dada espécie invasora. Os marcadores moleculares podem ser utilizados para estimar as diferenças genéticas entre indivíduos, dentro e entre espécies relacionadas ou populações. Também são empregados em estudos de sistemática molecular, entomologia molecular, dinâmica de populações, diagnósticos e *fingerprinting* genômico (BEHURA, 2006; FAKRUDIN *et al.*, 2006).

Segundo Fakrudin *et al.* (2006), a escolha de um marcador molecular depende de vários fatores como a disponibilidade, nível de detecção de polimorfismo desejado, disponibilidade de informações do genoma da espécie alvo, habilidades técnicas, disponibilidade de protocolos etc. Dessa forma, é difícil impor a superioridade de um tipo de marcador em relação a outro, uma vez que cada um apresenta sua particularidade.

Em entomologia, os marcadores moleculares têm sido usados com objetivo de avaliar e monitorar a diversidade genética de espécies de insetos; identificar marcadores ligados a genes que conferem resistência a inseticidas, possibilitando monitorar a frequência dos alelos resistentes em populações de espécies de inseto-alvo; identificar marcadores moleculares espécie-específico; genômica comparativa; estudar a biodinâmica de insetos praga e tendências evolutivas; e estudar populações naturais de insetos, uma vez que a variabilidade genética pode ser utilizada para definir a estrutura da população bem como medir o fluxo gênico entre populações. (FAKRUDIN *et al.*, 2006).

### 3.4- Marcadores Moleculares ISSR

Os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), representam uma das mais recentes classes de marcadores moleculares e foram descritos inicialmente por Zietkiewicz *et al.* (1994). Marcadores ISSR são obtidos por amplificação via PCR utilizando *primer* único, constituídos de seqüências repetidas de di ou trinucleotídeos. O número de repetições dos di ou trinucleotídeos é variável, mas geralmente são longos, produzindo *primers* de, no mínimo, 14 nucleotídeos. O *primer* microssatélite pode ser não-ancorado (GUPTA *et al.*, 1994) ou ancorado com um ou dois nucleotídeos, tanto na extremidade 5' quanto na extremidade 3' do oligonucleotídeo (WOLFE, 2005). A âncora garante que o *primer* se anele somente na extremidade do microssatélite ou permite que somente um subconjunto do microssatélite sirva como molde para amplificação (REDDY *et al.*, 2002).

Uma vantagem desse tipo de marcador é que as amplificações não requerem informação da seqüência do genoma e conduz a altos padrões

polimórficos. Cada banda detectada corresponde a uma seqüência de DNA delimitada por dois microssatélites invertidos e as bandas visíveis são definidas como marcadores dominantes e determinadas para locos genéticos como dois alelos: 1 indica presença e 0 ausência (REDDY *et al.*, 2002; WOLFE, 2005). Apesar do caráter dominante, também foi demonstrado que este marcador pode segregar-se como marcador co-dominante em alguns casos, o que permite a distinção entre indivíduos homocigotos e heterocigotos (REDDY *et al.*, 2002).

Em geral, para amplificação de marcadores *ISSR* são necessários cerca de 10 ng de molde de DNA por reação de amplificação e os produtos amplificáveis são geralmente de 200-2000 pb de comprimento (REDDY *et al.*, 2002). Estima-se que o método apresenta 92 a 95% de repetibilidade, possivelmente devido ao uso de *primers* longos quando comparado com *primers* de outros tipos de marcadores moleculares (BORNET e BRANCHARD, 2001; REDDY *et al.*, 2002).

O grau de polimorfismo detectado por essa técnica depende da natureza do *primer* (não ancorado, ancorado 3' ou ancorado 5'), da seqüência de repetições (*motif*), do método de detecção dos fragmentos e natureza do *primer*. Em geral, *primers* com repetições (AG), (GA) (CT) (TC) (AC) (CA), *primers* ancorados e detecção dos fragmentos amplificados por gel de poliacrilamida detectam alto polimorfismo quando comparados com outras condições de análise (REDDY *et al.*, 2002).

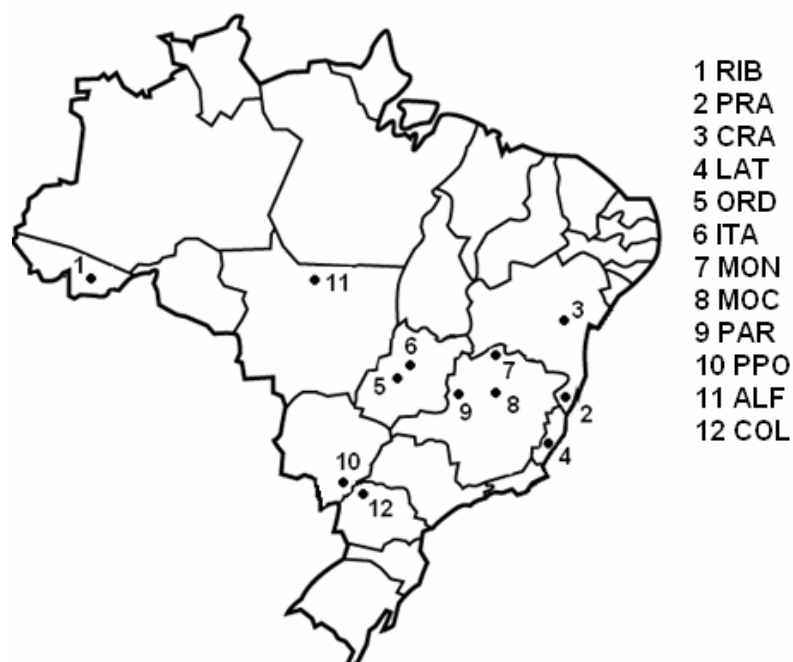
Em insetos, marcadores *ISSR* tem sido utilizados para identificar e discriminar espécies de parasitóides (LÉON *et al.*, 2004a), além de mensurar o nível de diferenciação genética de linhagens de parasitóides (BORBA *et al.*, 2005); para estimar a diversidade genética dentro de populações de insetos e determinar a estrutura genética de populações de insetos vetores de doenças em plantas e outros insetos pragas (KUMAR *et al.*, 2001; LÉON *et al.*, 2004b; LÉON e JONES, 2005); para comparar padrões de DNA em espécies diferentes (LUQUE *et al.*, 2002); para determinar a variabilidade genética em ecótipos de uma espécie (CHATTERJEE *et al.*, 2004) e para diferenciar espécies de um mesmo gênero ou diferenciar populações dentro de uma mesma espécie (DUSINSKY, 2006).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1-Obtenção de insetos

Amostras de feijão não-expurgado e com sinais de infestação por *Zabrotes subfasciatus*, foram obtidas de produtores rurais com histórico de produção própria de sementes e baixa escala de produção, por intermédio das empresas de extensão rural dos estados brasileiros amostrados. Os sinais de infestação são evidenciados pela presença de pequenas pontuações brancas aderidas ao tegumento do grão e por perfurações circulares no grão. Cerca de 250 a 500 g de amostras foram enviadas para o Laboratório de Biologia Molecular II, instalado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa-MG, onde foram mantidas individualizadas e em condições de multiplicação do inseto. Após a primeira eclosão dos ovos em laboratório, os insetos foram fixados ainda vivos em etanol 70% para posterior extração de DNA.

Avaliaram-se 269 indivíduos de 12 populações de *Z. subfasciatus* (FIGURA 3), distribuídas em oito estados brasileiros (Acre, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Paraná). As coordenadas geográficas dos locais de coleta das amostras foram estimadas com base na localização da cidade de origem através do aplicativo GOOGLE EARTH versão 3.0. Na Tabela 1 verifica-se as populações de *Z. subfasciatus* amostradas, com o número de indivíduos por população e a localização geográfica.



**FIGURA 3.** Localização das amostras de *Zabrotes subfasciatus* no Brasil. Os códigos das localidades correspondem aos demonstrados na TABELA 1

**TABELA 1-** Localização das amostras de *Zabrotes subfasciatus* e tamanho da amostra (N)

Localidade	N	Latitude(S)	Longitude(W)
Rio Branco, AC (RIB)	23	09°58'51"	67°49'13"
Prado, BA (PRA)	22	17°21'04"	39°13'09"
Cruz das Almas, BA (CRA)	21	12°40'12"	39°06'37"
Laranja da Terra, ES (LAT)	24	19°54'00"	41°04'12"
Ordália, GO (ORD)	24	16°12'39"	49°44'18"
Itauçu, GO (ITA)	14	16°11'57"	49°36'03"
Montalvânia, MG (MON)	24	14°25'42"	44°22'34"
Montes Claros, MG (MOC)	24	16°41'33"	43°49'47"
Paracatu, MG (PAR)	22	17°12'00"	46°52'12"
Ponta Porã, MS (PPO)	23	22°31'51"	55°43'49"
Alta Floresta, MT (ALF)	24	09°54'00"	55°54'37"
Colorado, PR (COL)	24	22°49' 47"	51°58'55"
Total:	269		

#### 4.2- Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de insetos fixados ainda vivos em etanol 70% com base em modificações do protocolo de Clark *et al.* (2001). Cada inseto foi macerado individualmente em nitrogênio líquido em microtubos de 1,5 mL de capacidade, posteriormente acrescentou-se 500  $\mu$ L de tampão CTAB constituído de 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1,4 mM NaCl, 0,02 M EDTA (pH 8,0), CTAB (2%) e  $\beta$ -mercaptoetanol (0,2%- adicionado separado dos demais componentes do tampão). Posteriormente adicionou-se 5  $\mu$ L de proteinase K (20 mg/mL). As amostras foram homogeneizadas em agitador tipo vórtex e incubadas a 65 °C em banho-maria por 60 minutos. Após incubação, adicionou-se 15  $\mu$ L de RNase A (50 mg/mL), seguida de uma nova homogeneização, posterior incubação à 37 °C por aproximadamente 150 minutos, (homogeneizando-se a cada 30 min). Depois desse período, as amostras foram centrifugadas a 10400 rpm por 5 min, à temperatura ambiente, e o sobrenadante transferido para um novo microtubo de 1,5 mL. Posteriormente, adicionou-se 500  $\mu$ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v), seguindo-se de nova centrifugação a 10400 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e as amostras foram então precipitadas com 500  $\mu$ L de isopropanol mantido a -20 °C (100%) e incubadas a 4 °C durante a noite. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas à temperatura ambiente por 10-12 minutos a 10400 rpm, e o sobrenadante foi descartado em seguida. Adicionou-se 700  $\mu$ L de etanol 70% mantido a -20 °C, seguido por centrifugação a 10400 rpm por 2 min. O sobrenadante foi então descartado, e, em seguida, o procedimento anterior foi repetido com a adição de etanol 95%. O sobrenadante foi novamente descartado e o DNA precipitado (*pellet*) foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 30-50 $\mu$ L de tampão TE (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7,6) e mantido a 4 °C durante a noite.

A quantidade de DNA total foi estimada por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0,2  $\mu$ g/mL de brometo de etídio, comparando-se as amostras com DNA do fago  $\lambda$  de quantidade conhecida e fotografado sob luz ultravioleta.

#### 4.3- Escolha e amplificação dos primers ISSR

Inicialmente foram testados 26 dos 100 *primers* do conjunto 9 da *University of British Columbia*. Os testes foram realizados em dois indivíduos de duas populações aleatórias, e a partir dos padrões de amplificação obtidos foram selecionados 15 *primers*. Posteriormente, novos testes foram feitos para otimizar as reações de PCR, testando-se temperatura de anelamento dos *primers*, concentração de MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM ou 2,0 mM), concentração de formamida (1% ou 2%) e quantidade de DNA. Assim, após esses testes, foram selecionadas as melhores condições de amplificação para cada *primer* e os cinco *primers* que apresentaram os melhores padrões de bandas foram selecionados para serem utilizados nesse estudo (TABELA 2). Cada reação de amplificação foi feita em um volume final de 15 µL, consistindo de 1% de formamida (para os *primers* 808, 811 e 891) ou 2% de formamida (para os *primers* 807; 809); 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub> (para os *primers* 807, 808, 811 e 891) ou 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (para o *primer* 809), 0,5 U de *Taq polimerase*, 10 a 20 ng de DNA molde, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de *primer*, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM KCl, e 0,1% de Tween-20 e água ultra-pura autoclavada.

As amplificações foram realizadas em termociclador da GeneAmp PCR System Modelo 9.700. As condições de amplificação foram adaptadas de Huang e Sun (2000): etapa inicial de desnaturação de 5 minutos a 94 °C, seguida por 35 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos para anelamento do *primer* (com temperatura de anelamento específica para cada *primer*), 1 minuto e 50 segundos a 72 °C e uma etapa final de 7 minutos a 72 °C para extensão final. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X (90 mM Tris Base, 90 mM ácido bórico e 2 mM EDTA) com tensão constante de 110 V. Posteriormente os géis foram corados em solução de brometo de etídeo 0,6 ng/mL e os fragmentos visualizados por meio de luz ultravioleta. As imagens foram digitalizadas em sistema de captura de imagens (Eagleye<sup>TM</sup> - Stratagene®). O tamanho dos fragmentos amplificados foi

estimado por comparação com marcador molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen).

**TABELA 2-** *Primers ISSR* utilizados para amplificação, com temperatura de anelamento ( $T_m$ ) e número total de bandas (NTB).

Código	Seqüências (5'-3')	$T_m$ (°C)	NTB
UBC 807	(AG) <sub>8</sub> T	50°C	12
UBC 808	(AG) <sub>8</sub> C	54°C	8
UBC 809	(AG) <sub>8</sub> G	51°C	13
UBC 811	(GA) <sub>8</sub> C	51°C	11
UBC 891	HVH (TG) <sub>7</sub> *	47°C	7
Total			51

\*H=(A,C ou T)

#### 4.4- Análise de dados

Os fragmentos de DNA foram analisados visualmente, e bandas fracas e com pequena reprodutibilidade foram excluídas das análises.

Uma matriz binária (presença ou ausência da banda) foi obtida e utilizada para estimar os índices de diversidade genética dentro e entre populações.

O programa POPGENE versão 1.3 (YEH *et al.*, 1999) foi utilizado para calcular a estatística da variação genética de cada população sobre o pressuposto de que as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Marcadores dominantes não permitem que os indivíduos heterozigotos sejam distinguidos na amostra estudada. Dessa forma, em populações com acasalamentos ao acaso, a frequência dos alelos pode ser inferida assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg. As estimativas incluíram a porcentagem de locos polimórficos (P), heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) e índice de diversidade genética de Shannon (I).

Estimou-se os valores de diferenciação genética,  $F_{ST}$  e  $G_{ST}$ , da espécie. O valor  $G_{ST}$  representa o coeficiente de diferenciação gênica relativa à população total. Valores de  $G_{ST}$  só podem ser comparados entre populações que apresentam sistemas de acasalamento similares (Nei,

1973). O valor  $F_{ST}$  também representa um índice de diferenciação genética da população e determina qual proporção da variabilidade genética total é devido a diferenças genéticas entre populações e qual proporção é devido a diferenças entre indivíduos (MORK, 2000). Em análise de marcadores dominantes, na qual há dois alelos no loco, o valor de  $G_{ST}$  é idêntico ao índice  $F_{ST}$  de Wright e parece produzir dados confiáveis que são relativamente insensíveis às pressuposições do Equilíbrio de Hardy Weinberg, heterozigosidade e nível de endogamia (ARAFEH *et al.*, 2002).

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada através do programa ARLEQUIN versão 3.1 (EXCOFFIER *et al.*, 2005). A árvore filogenética foi obtida a partir dos valores de  $F_{ST}$ , pelo método do *Neighbor Joining* (NJ), pelo programa MEGA versão 3.1 (KUMAR *et al.*, 2004).

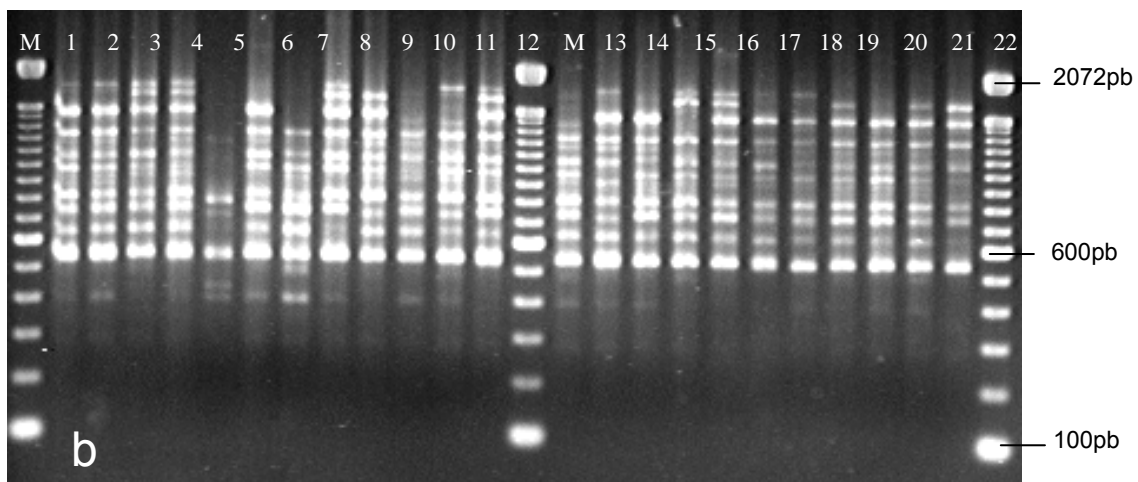
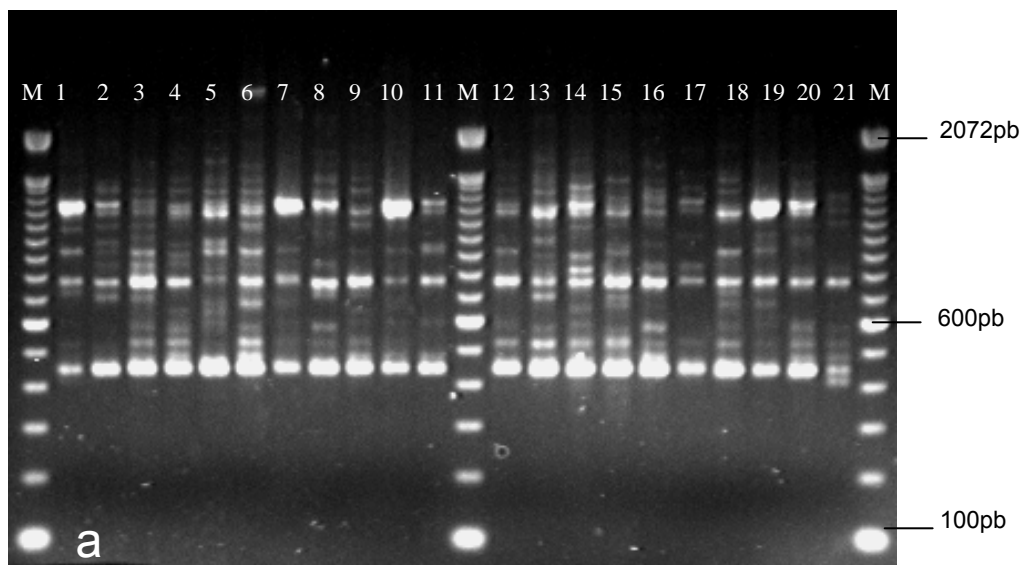
O teste de Mantel (Mantel, 1967), como implementado pela rotina MXCOMP dentro do programa NTSYS-pc, versão 2.2K, com 9000 permutações ao acaso, foi usado para investigar a correlação entre  $F_{ST}$ , identidade genética de Nei e diversidade genética de Nei, baseado nas matrizes cofenéticas. O Teste de Mantel também foi usado para investigar a correlação entre distância geográfica e distâncias genéticas (dadas pelas estimativas de  $F_{ST}$ ) nas populações amostradas. Com este objetivo, a matriz de distâncias geográficas foi obtida estimando a distância geográfica em quilômetros (km) entre todas as 12 populações amostradas, usando o aplicativo GOOGLE EARTH versão 3.0.

A correlação calculada pelo teste de Mantel, varia de -1 a +1, e mede a correlação entre duas matrizes com relação ao Z randômico ( $Z_{rnd}$ ), que é calculado após permutações aleatórias das fileiras e colunas dos elementos fora das diagonais das matrizes avaliadas. Para valores negativos de  $r$ , quanto menor a frequência do  $Z_{rnd} \leq Z_{obs}$  maior a correlação entre as duas matrizes. Para valores positivos de  $r$ , quanto menor a frequência de  $Z_{rnd} \geq Z_{obs}$ , maior será a correlação  $r$ .

## 5-RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1- Diversidade genética dentro de populações

Foram avaliados 269 indivíduos de 12 populações brasileiras, com amostragem média de 22 indivíduos por população. Os cinco *primers* utilizados apresentaram bandas amplificáveis e reproduzíveis. Um total de 52 bandas foi identificado, das quais apenas uma banda foi monomórfica, sendo essa excluída da análise. Os fragmentos amplificados apresentaram tamanhos variando de 300 a 2072 pb, entretanto apenas os fragmentos de 300 a 2000 pb foram considerados para a genotipagem devido à maior reprodutibilidade. Para cada *primer* utilizado, 7 a 13 bandas foram detectadas, com uma média de 10 bandas por *primer*. Verifica-se, na Figura 4, o padrão de amplificação de dois *primers* ISSR usados neste estudo (*primers* UBC 807 e UBC 809).



**FIGURA 4.** Padrão de amplificação de *primers ISSR* revelado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%: a- *Primer* UBC 807, população CRA; b- *primer* UBC 809, população RIB. M: marcador molecular de 100pb.

A porcentagem de polimorfismo, dentro de cada população, variou de 74,51 (populações PAR e RIB) a 92,16 (população ALF), com porcentagem média de 83,82 (TABELA 3).

Diversos estudos utilizam marcadores moleculares dominantes, incluindo os marcadores *ISSR* para estimar o grau de diversidade genética dentro e entre populações de diversas pragas de importância agrícola. Kumar *et al.* (2001) utilizaram nove *primers ISSR* para estimar a diversidade genética de 28 populações de *Scirpophaga insertulas* (Lepidoptera: Crambidae), uma importante praga do arroz (*Oryza sativa*). Os resultados mostraram a detecção de 79 bandas das quais 84% foram polimórficas com uma média de 7,4 bandas polimórficas por *primer*. Kim e Sappington (2004) utilizaram 11 *primers RAPD* para acessar a diversidade genética de oito populações de *Anthonomus grandis*, praga do algodoeiro. Os autores observaram uma média de 11,2 bandas por *primer* sendo detectadas 67 bandas, com porcentagem de polimorfismo variando de 36,4 a 64,3% nas populações.

A heterozigosidade esperada corrigida de Nei (1978) ( $H_E$ ), variou de 0,1281 a 0,3281, com média de 0,270 e o índice de diversidade genética de de Shannon e Weaver (1949) ( $I$ ) variou de 0,1893 a 0,4805, com média de 0,3870 (TABELA 3). No nível de espécie, estes dois índices apresentaram valores médios de 0,3626 e 0,5381, respectivamente. Kim e Sappington (2006), avaliando dezoito populações de uma praga do algodão (*Anthonomus grandis*) com marcadores microssatélites, observaram valores de  $H_E$  variando de 0,078 a 0,589.

**TABELA 3-** Diversidade genética dentro de populações de *Z. subfasciatus* e em nível de espécie.

Populações	N	P(%)	H <sub>E</sub>	I
RIB	23	74,51	0,2765	0,4074
PRA	22	82,35	0,2827	0,4228
CRA	21	86,27	0,3281	0,4795
LAT	24	86,27	0,3114	0,4608
ORD	24	80,39	0,2829	0,4187
ITA	14	86,27	0,2781	0,4230
MON	24	88,24	0,2948	0,4418
MOC	24	88,24	0,2253	0,3538
PAR	22	74,51	0,2710	0,3259
PPO	23	88,24	0,3256	0,4805
ALF	24	92,16	0,2908	0,2908
COL	24	78,43	0,2953	0,4351
Média	22	83,82	0,2885	0,4117
Espécie	269	100	0,3636	0,5393

N, tamanho da amostra; P(%) porcentagem de polimorfismo; H<sub>E</sub>, heterozigiosidade esperada corrigida de Nei (1978) (assumindo Equilíbrio de Hardy-Weinberg); I, índice de diversidade genética de Shannon e Weaver (1949)

#### 5.2- Diversidade genética entre populações e análise de agrupamento

A análise de variância dos dados moleculares (AMOVA) permitiu uma partição da variação genética em dois níveis: dentro de populações e entre populações. Foi observada maior variação genética dentro da população, com 66% da variação total. Apenas 34% da variação genética foi observada entre populações. Os valores de variação genética foram significativos para as duas fontes de variação, com probabilidades calculadas por 1000 permutações ao acaso (TABELA 4).

**TABELA 4-** Análise de variância molecular (AMOVA) dentro e entre populações de *Zabrotes subfasciatus*

Fonte de variação	g.l	Soma dos quadrados	Componente de variância	Variação total (%)	Valor de P*
Entre populações	11	215,738	0,80496	33,58	<0,001
Dentro de populações	257	409,214	1,59227	66,42	<0,001
Total	268	624,952	2,39723		

g.l.= graus de liberdade; \*Valor de P é a probabilidade de ter um componente de variância ao acaso maior que os valores observados. As probabilidades foram calculadas por 1000 permutações ao acaso.

A identidade genética de Nei (1978), calculada entre pares de populações, variou de 0,7226 (MOC e PPO) a 0,9452 (PRA e MON). Estes altos valores (próximos a 1) mostram o alto grau de similaridade genética entre as populações de *Zabrotes subfasciatus* avaliadas (TABELA 5).

A distância genética de Nei (1978), calculada para inferir a divergência genética entre populações, variou de 0,0640 a 0,3250. O menor valor foi observado entre as populações MOC e PRA enquanto que o maior valor foi observado entre as populações MOC e PPO. Os valores de distância genética foram empregados para a construção do dendrograma utilizando o método UPGMA (Figura 5). A análise do dendrograma identificou dois grupos principais: no primeiro grupo foram agrupadas as populações LAT, ITA, PPO, ORD, CRA, RIB e COL e, no segundo grupo, as populações PAR, ALF, MOC, PRA e MON. O agrupamento das populações não mostrou relação entre distância genética e distância geográfica visto que os dois grupos formados incluíram populações dos diferentes estados brasileiros amostrados. Apesar disso, pode-se observar no segundo grupo uma discreta relação entre distribuição geográfica e origem das populações, uma vez que houve o agrupamento das três populações amostradas do estado de MG (PAR, MOC e MON) e uma do sul da Bahia (PRA), populações separadas em média por 490 km. Apenas a população ALF (estado de MT) não apresentou relação com a distância geográfica nesse grupo. Os resultados sugerem que provavelmente há um extensivo transporte, de uma região a outra, de material vegetal infestado pelo inseto.

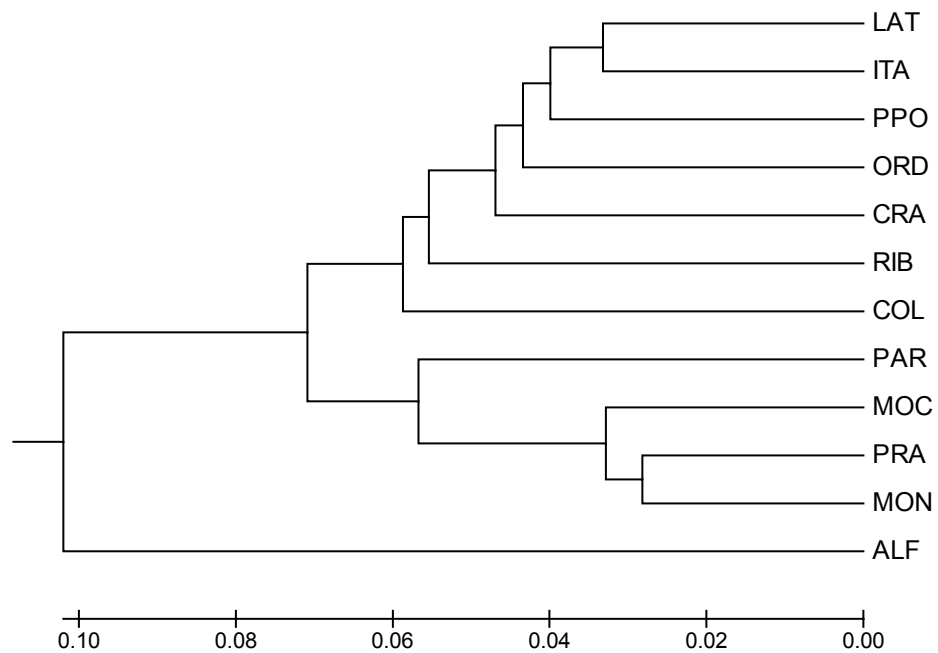
Blanc *et al.* (2006) avaliaram a variabilidade genética de populações de *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae), praga de tabaco (*Nicotiana obtusifolia*) e outros produtos armazenados, através de marcadores AFLP e também observaram que o agrupamento obtido não revelou a origem geográfica das populações analisadas, pois os grupos formados incluíram populações de diferentes pontos amostrados. Os autores atribuíram a ausência de estrutura geográfica entre as populações ao transporte de material vegetal infestado entre regiões. Em estudo realizado por Brown *et al.* (1997) com marcadores RAPD, o agrupamento de nove linhagens da principal praga de grãos armazenados, *Oryzaephilus*

*surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae), também parece não estar associado com a origem geográfica.

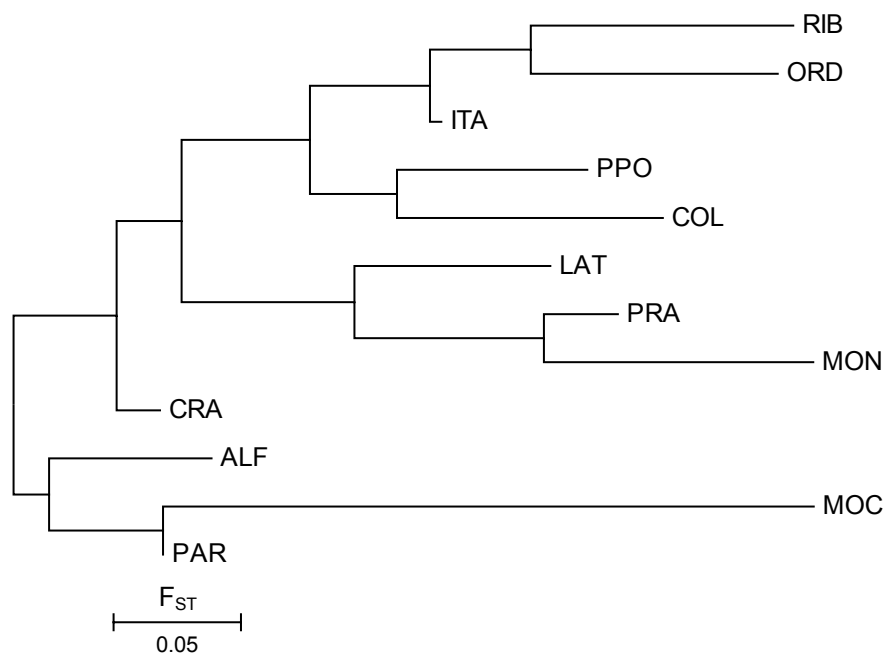
O dendrograma obtido pelo método *Neighbor Joining* (NJ) (Figura 6) também não mostrou padrão de distribuição geográfica da espécie. Entretanto há um discreto agrupamento de populações mais próximas geograficamente.

**TABELA 5-** Medidas corrigidas de Nei (1978) da identidade genética (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) entre 12 populações de *Zabrotes subfasciatus* analisadas.

	RIB	PRA	CRA	LAT	ORD	ITA	MON	MOC	PAR	PPO	ALF	COL
RIB	-	0,8729	0,8769	0,9046	0,9143	0,9053	0,8486	0,8001	0,8155	0,8641	0,8755	0,8645
PRA	0,1359	-	0,9034	0,9243	0,8688	0,8984	0,9452	0,9380	0,8761	0,8234	0,9208	0,8216
CRA	0,1314	0,1016	-	0,9220	0,8945	0,9152	0,8868	0,8499	0,8383	0,8607	0,9103	0,8805
LAT	0,1003	0,0787	0,0812	-	0,9147	0,9357	0,9348	0,8889	0,8782	0,8374	0,9203	0,8785
ORD	0,0896	0,1407	0,1115	0,0891	-	0,9173	0,8656	0,8038	0,8446	0,8455	0,9187	0,8998
ITA	0,0995	0,1071	0,0886	0,0664	0,0864	-	0,9241	0,8745	0,8966	0,8134	0,9264	0,9031
MON	0,1642	0,0563	0,1202	0,0674	0,1444	0,0790	-	0,9349	0,8963	0,7820	0,8994	0,8429
MOC	0,2231	0,0640	0,1626	0,1177	0,2184	0,1341	0,0673	-	0,9062	0,7226	0,8847	0,7860
PAR	0,2039	0,1323	0,1764	0,1298	0,1689	0,1091	0,1094	0,0985	-	0,7791	0,9144	0,8374
PPO	0,1461	0,1943	0,1500	0,1775	0,1679	0,2065	0,2459	0,3250	0,2496	-	0,8376	0,8160
ALF	0,1330	0,0825	0,0940	0,0831	0,0848	0,0764	0,1061	0,1225	0,0894	0,1773	-	0,9097
COL	0,1456	0,1965	0,1272	0,1295	0,1056	0,1019	0,1709	0,2408	0,1775	0,2033	0,0946	-



**FIGURA 5.** Dendrograma obtido pelo método UPGMA baseado nas distâncias genéticas de Nei (1978) utilizando 51 bandas de *ISSR* detectadas em 12 populações de *Zabrotes subfasciatus*. Códigos das localidades: RIB: Rio Branco-AC; PRA: Prado-BA; CRA: Cruz das Almas-BA; LAT: Laranja da Terra-ES; ORD: Ordália-GO; ITA: Itauçu-GO; MON: Montalvânia-MG; MOC- Montes Claros-MG; PAR: Paracatu-MG; PPO: Ponta Porã-MS; ALF: Alta Floresta-MT; COL: Colorado-PR.



**Figura 6.** Dendrograma obtido pelo método do vizinho mais próximo, baseado nos valores de distância genética ( $F_{ST}$ ) utilizando 51 bandas de *ISSR* detectadas em 12 populações de *Zabrotes subfasciatus*.

O valor de diferenciação genética das populações ( $F_{ST}$ ) 0,33579 obtido pela AMOVA foi significativo com probabilidades calculadas por 1000 permutações ao acaso e  $p < 0,001$ . Este valor indica que aproximadamente 34% da variância genética total é devido às diferenças entre populações e 66% é devido às diferenças entre indivíduos dentro das populações.

Os valores de  $F_{ST}$  entre pares de populações (TABELA 6), obtidos na AMOVA variaram de 0,068042 a 0,6165. Todos os valores de  $F_{ST}$  entre pares de populações foram significativos a 5% de probabilidade.

Kim e Sappington (2006) utilizando marcadores microssatélites, observaram valores de  $F_{ST}$  entre pares de populações variando de -0,014 a 0,573, revelando baixo nível de diferenciação genética entre as 18 populações norte americanas de *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), importante praga do algodão.

O valor  $G_{ST}$ , índice de diferenciação genética relativa à população total (Nei, 1973), foi estimado em 0,2652. Ao contrário do que foi observado por Kim e Sappington (2006), em populações de *Anthonomus grandis* avaliadas com marcadores microssatélites, em que ocorreram valores similares de diferenciação genética para  $F_{ST}$  e  $G_{ST}$  (0,24 e 0,22, respectivamente), os valores observados desses dois índices para as doze populações de *Zabrotes subfasciatus* avaliadas não foram correspondentes (0,3376 e 0,2652 respectivamente).

A diversidade genética representa um importante requisito para as mudanças adaptativas e evolutivas das espécies e populações às condições desfavoráveis no meio, como por exemplo, exposição a agentes inseticidas. A utilização contínua de inseticidas seleciona os indivíduos mais resistentes da população (FRAGOSO *et al.*, 2003). Dessa forma, populações de praga que apresentam alta variabilidade genética são mais propícias a desenvolver tolerância aos inseticidas.

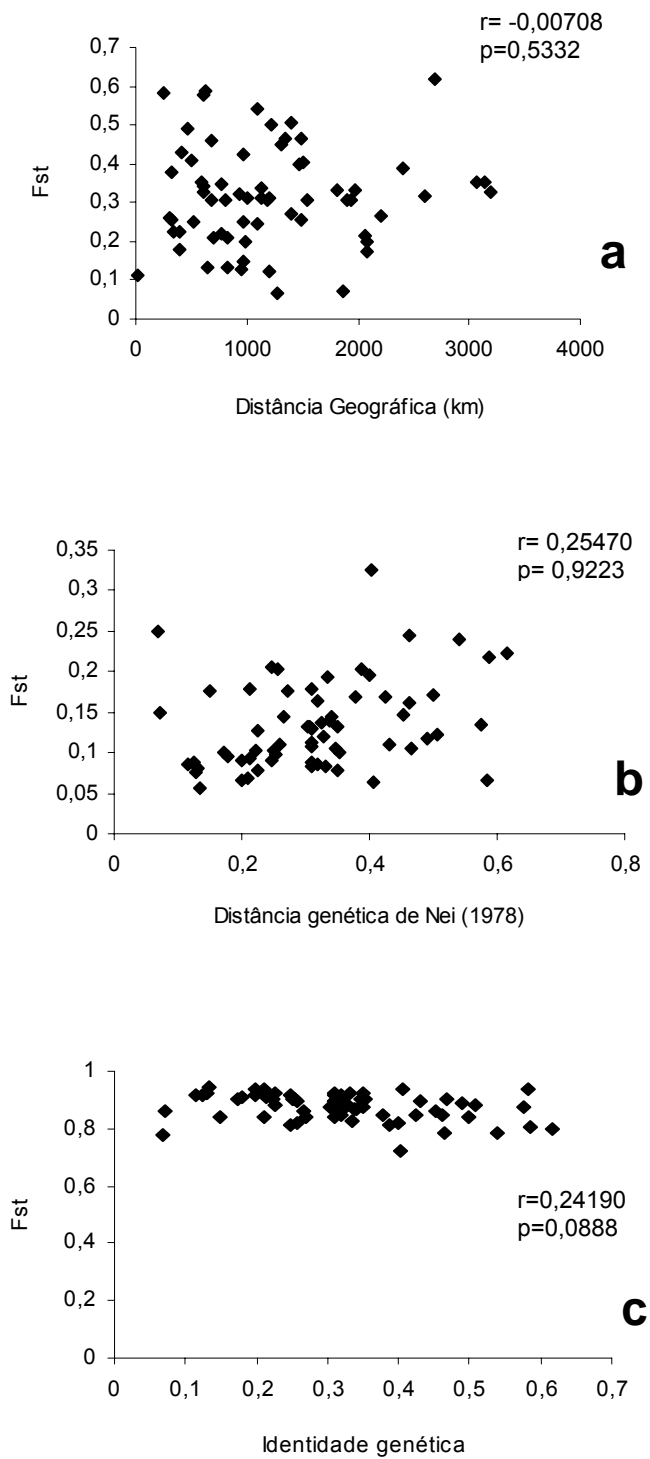
**TABELA 6-** Valores de diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) (abaixo da diagonal) e distância geográfica (Km) (acima da diagonal) de 12 populações de *Zabrotes subfasciatus*

	RIB	PRA	CRA	LAT	ORD	ITA	MON	MOC	PAR	PPO	ALF	COL
RIB	-	3192,07	3143,08	3070,78	2074,77	2088,3	2593,81	2694,59	2398,82	1938,11	1892,63	2204,04
PRA	0,32491*	-	517,43	342,82	1126,92	1122,63	638,99	498,32	812,7	1717,47	1817,53	1463,35
CRA	0,35106*	0,25118*	-	826,18	1209,42	1195,01	601,59	679,36	972,41	1970,33	2069,14	386,34
LAT	0,35185*	0,22619*	0,13135*	-	1003,1	990,35	699,36	458,59	680,45	1448,88	1547,16	1175,41
ORD	0,19943*	0,33817*	0,31040*	0,31057*	-	14,23	607,9	629,28	324,46	852,19	939,36	768,66
ITA	0,17329*	0,31034*	0,12367*	0,19960*	0,11431*	-	593,66	615,03	311,23	862,34	950,4	774,43
MON	0,31852*	0,13451*	0,32673*	0,21021*	0,34173*	0,35116*	-	259,27	406,26	1398,11	1494,49	1226,29
MOC	0,61650*	0,40646*	0,46167*	0,48926*	0,58634*	0,57579*	0,58376*	-	324,64	1299,27	1398,88	1085,32
PAR	0,38735*	0,30601*	0,14926*	0,30853*	0,37830*	0,25844*	0,43156*	0,25438*	-	999,91	1097,94	820,02
PPO	0,45199*	0,33311*	0,07235*	0,30352*	0,42557*	0,24824*	0,46400*	0,40275*	0,06804*	-	100,3	289,37
ALF	0,30442*	0,33051*	0,21310*	0,32883*	0,31962*	0,12896*	0,46636*	0,50714*	0,24759*	0,27061*	-	386,34
COL	0,26542*	0,39992*	0,22553*	0,41785*	0,34809*	0,22166*	0,49979*	0,54007*	0,21165*	0,25594*	0,17876*	-

\*Significativo a 5% de probabilidade

O teste de Mantel revelou baixa correlação entre distância geográfica e  $F_{ST}$ , ( $r=-0,000708$ ,  $p[Z_{rdm} \leq Z_{obs}]=0.5332$ ); identidade genética e  $F_{ST}$  ( $r= -0,24190$ ,  $p[Z_{rdm} \leq Z_{obs}]=0.0888$ ), e entre distância genética de Nei e  $F_{ST}$  ( $r= 0,25470$ ,  $p[Z_{rdm} \leq Z_{obs}]=0.9223$ ) (Figura 7).

O gráfico de correlação entre  $F_{ST}$  e distância geográfica seguiu umas das relações hipotéticas propostas por Hutchison e Templeton (1999). A hipótese sugerida pelos autores reflete as mudanças nas condições ambientais levando à fragmentação da região invadida em fragmentos menores, isolando as populações. Dessa forma, a deriva genética exerce maior influência nas populações que o fluxo gênico. O padrão resultante reflete extremo isolamento, em que a frequência dos alelos em cada população permite a deriva genética independente da relação com as distâncias geográficas que as separam e a amostragem dos gametas ao acaso gera um amplo grau de dispersão entre os pontos plotados, que também são independentes de distância geográfica.



**Figura 7.** Correlações obtidas pelo teste de Mantel. a- distância genética ( $F_{ST}$ ) e distância geográfica; b- distância genética ( $F_{ST}$ ) e distância genética de Nei (1978); c- distância genética ( $F_{ST}$ ) e identidade genética de Nei.

Pouco se sabe sobre a estrutura genética de populações de *Zabrotes subfasciatus* por meio de marcadores moleculares. Estudos sobre a estrutura genética de *Z. subfasciatus* com base em marcadores moleculares são ainda incipientes. González-Rodríguez *et al.* (2002) avaliaram a diversidade genética dessa espécie baseado em dados de aloenzimas. Os resultados mostraram que a espécie apresentou três locos polimórficos dos seis locos aloenzimáticos estudados, revelando alto grau de subdivisão entre as cinco populações mexicanas de *Z. subfasciatus* avaliadas. Ainda nesse trabalho, observou-se que a distância genética corrigida de Nei (1978) entre as populações variou de 0,421 a 0,643 e um valor significativo de  $F_{ST}$  de 0,305, indicando que 31% da variação genética total é devido às diferenças entre populações. Aebi *et al.* (2004) testaram seis marcadores microssatélites em fêmeas de duas populações mexicanas de *Z. subfasciatus*, revelando o potencial destes marcadores para estudos de variação genética entre populações e para determinar a função da variação da planta hospedeira e domesticação de plantas sobre a evolução das espécies.

Apesar da considerável diversidade genética observada dentro das populações de *Z. subfasciatus* avaliadas, no presente estudo, quando se considera a diversidade genética em nível de espécie, os valores observados de  $H_E$  (0,3636) e  $I$  (0,5393) revelaram pouca diversidade. Estes resultados provavelmente refletem a introdução recente da espécie no país e uma única fonte de origem comum às populações amostradas.

## 6- CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode se concluir que:

- 1- A metodologia desenvolvida para extração de DNA e amplificação de *primers ISSR* foi eficiente em *Zabrotes subfasciatus*.
- 2- A variabilidade genética da espécie ainda é considerada baixa no Brasil, provavelmente devido à introdução recente da praga.
- 3- Foi observado que a variação genética de populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus* está particionada em dois níveis: dentro e entre populações. Apenas 34% da variação genética total é devido a diferenças entre populações e 66% da variação genética total é devido a diferenças entre indivíduos. As populações de *Zabrotes subfasciatus* avaliadas não se apresentam geograficamente estruturadas no Brasil.

## 7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, T., AMPOFO, J.K.O. 1996. Insect pests of beans in Africa: their ecology and management. *Annual Review of Entomology*, v. 4, p. 45-73, 1996.

ABREU, A.F.B. 2005. Cultivo do feijão da primeira e segunda safras na Região Sul de Minas Gerais. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoPrimSeqSafrasulMG/index.htm>. Acesso em: 08 de janeiro de 2007.

AEBI, A., SHANI, T., BUTCHER, R.D.J *et al.* Isolation and characterization of polymorphism microsatellite markers in *Zabrotes subfasciatus* Boheman (Coleoptera: Bruchidae). *Molecular Ecology Notes*, v. 4, p. 752-754, 2004.

ALVAREZ, N., MCKEY, D., HOSSAERT-MCKEY, M., BORN, C., MERCIER, L., BENREY, B. Ancient and recent evolutionary history of the bruchid beetle, *Acanthoscelides Obtectus* Say, a cosmopolitan pest of beans. *Molecular Ecology*, v.14, p.1015-1024, 2005.

ARAFEH R.M.H., SAPIR Y., SHMIDA A., IRAKI N., FRAGMAN O., COMES H.P. Patterns of genetic and phenotypic variation in *Iris haynei* and *I. atrofusca* (*Iris* sect. *Oncocyclus* = the royal irises) along an ecogeographical gradient in Israel and the West Bank . *Molecular Ecology*, v. 11, n. 1, p. 39-53, 2002.

BEHURA, S. Molecular markers systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology*, v. 15, p. 3087-3113, 2006.

BLANC, M.P., LUGON-MOULIN, N., PANIGHINI, C. *et al.* Structure of worldwide populations of *Lasioderma serricornis* (Coleoptera: Anobiidae) as revealed by amplified fragment length polymorphism profiles. *Bulletin of Entomological Research*, v. 96, p. 111-116, 2006.

BORBA, R.S., GARCIA, M.S., KOVALESKI, A., OLIVEIRA, A.C., ZIMMER, P.D., CASTELO BRANCO, J. S.; MALONE, G. Genetic dissimilarity of lines of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) through ISSR markers. *Neotropical Entomology*, v. 34, n. 4, p. 565-569, 2005.

BORÉM, A., CARNEIRO, J.E.S. A Cultura. In: VIEIRA, C., PAULA JÚNIOR, T.J. BORÉM, A. (ed). *Feijão*. 2ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006, cap. 1, p.13-18.

BORNET, B; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 19, p. 209–215, 2001.

BROWN, R.J.; MALCOLM, C.A.; MASON, P.L. *et al.* Genetic differentiation between and within strains of the saw-toothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) at RAPD loci. *Insect Molecular Biology*, v. 6, n. 3, p. 285-9. 1997.

CHATTERJEE, S.N., VIJAYAN, K., ROY, G.C., NAIR, C.V. ISSR profiling of genetic variability in the ecotypes of *Antheraea mylitta* Drury, the Tropical Tasar Silkworm. *Russian Journal of Genetics*, v. 40, n. 2, p. 210-217, 2004.

CLARK, T.L., MEINKE, L.J., FOSTER, J.E. Molecular phylogeny of *Diabrotica* beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) inferred from analysis of combined mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Insect Molecular Biology*, n. 10, v. 4, p. 303–314, 2001.

DUŠINSKÝ, R., KÚDELA, M., STLOUKALOVÁ, V., JEDLIČKA, L. Use of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for discrimination between and within species of blackflies (Diptera: Simuliidae). *Biologia, Brastislava*, n. 61, v. 3, p. 299-304, 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. 2005 (Arroz e Feijão). *Origem e História do Feijão*. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/feijao/historia.htm>. Acesso em: 23 de novembro de 2006.

EXCOFFIER, L., LAVAL, G., SCHNEIDER, S. Arlequin version 3.1. An integrated software package for population genetics data analysis. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG). Institute of Zoology. University of Berne. 2005.

FAKRUDIN, B., VIJAYKUMAR, K.B.K, PATIL, B.V., KURUVINASHETTI, M. S.: DNA. DNA-based marker systems and their utility in entomology. *Entomologica Fennica*, v. 17, p. 21-33, 2006.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998, 220p.

FRAGOSO, D.B.; GUEDES, R.N.C.; LADEIRA, J.A. Seleção na evolução de resistência a organofosforados em *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Neotropical Entomology*, v. 32, n. 2, p. 329-334, 2003.

GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S. *et al. Manual de Entomologia agrícola*. São Paulo: Agronômica Ceres, 1988, 649p.

GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S. *et al. Manual de Entomologia agrícola*. 2ed. Piracicaba: FEALQ, 2002, 920p.

GEPTS, P., DEBOUCK, D. Origin, domestication and evolution of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: SHOONHOVEN, A. van. (ed). *Common bean: research for crop improvement*. Wallingford: CAB. cap. 1. 1991.

GEPTS, P., KMIĘCIK, K., PEREIRA, P., BLISS, F.A. Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. I- The Americas. *Economic Botany*, v. 42, p. 73-85, 1988.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A., BENREY, B., CALLEJAS, A., OYAMA, K. 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*, v. 92, p. 185-189, 2002.

GUPTA, M., CHYI, Y.-S., ROMERO-SEVERSON, J., OWEN, J.L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, n. 89, p. 998-1006, 1994.

HILL, D.S. *Pests of stored products and their control*. New York: CRC Press. 1990, 274p.

HUANG, J. C.; SUN, M. Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 100, n. 7, p.1050-1060, 2000.

HUTCHISON, D.W.; TEMPLETON, A.R. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution*, v. 53, n. 6, p. 1898-1914, 1999.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2006. Indicadores IBGE: estatística da produção agrícola. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>. Acesso em: 15 de janeiro de 2007.

KAPLAN, L. What is the origin of the common bean? *Economic botany*, v. 35, n. 2, p. 240-257, 1981.

KIM, K. S., SAPPINGTON, T. W. Genetic structuring of boll weevil populations in the US based on RAPD markers. *Insect Molecular Biology*, v. 13. n. 3, p. 293-303, 2004.

KIM, K.S., SAPPINGTON, T. W. Molecular genetic variation of boll weevil populations in North America estimated with microsatellites: implications for patterns of dispersal. *Genetica*, v. 127, p. 143-16, 2006.

KORNEGAY, J., CARDONA, C. Breeding for insect resistance in beans. In: SCHOONHOVEN, A. van, VOYSEST, O. (ed). *Common bean: research for*

*crop improvement*. Colombia: Ciat (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cap. 11, p. 619-648. 1991.

KUMAR S, TAMURA K & NEI M. MEGA 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, v. 5, p. 150-163, 2004.

KUMAR, L.S., SAWANT, A.S., GUPTA, V.S., RANJEKAR, P.K. Comparative analysis of genetic diversity among Indian populations of *Scirpophaga incertulas* by ISSR-PCR and RAPD-PCR. *Biochemical Genetics*, v. 39 n. 9-10, p. 297-309, 2001.

LEÓN, J. H., JONES, W. A. Genetic differentiation among geographic populations of *Gonatocerus ashmeadi*, the predominant egg parasitoid of the glassy-winged sharpshooter, *Homolodisca coagulata*. *Journal of Insect Science*, v. 5, n. 2, 2005. Disponível em: [insectscience.org/5.2](http://insectscience.org/5.2).

LEÓN, J.H., JONES, W.A., MORGAN, D.J. Molecular distinction between populations of *Gonatocerus morrilli*, egg parasitoids of the glassy-winged sharpshooter from Texas and California: Do cryptic species exist? *Journal of Insect Science*, v. 4, n. 39, 2004a. Disponível em: [insectscience.org/4.39](http://insectscience.org/4.39).

LEÓN, J.H., JONES, W.A., MORGAN, D.J. Population genetic structure of *Homolodisca coagulata* (Homoptera: Cicadellidae), the vector of the bacterium *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease in grapevines. *Annals of Entomological Society of America*, v. 97, n. 4, 809-818, 2004b.

LUQUE, C., LEGAL, L., STAUDTER, H., GERS, C., WINK, M. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepidoptera). *Hereditas*, v. 136, n. 3, p. 251-253. 2002.

MAGALHÃES, B.P., CARVALHO, S.M. 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, 1988, p. 573-589.

MANTEL, N. A. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, v. 27, p. 209-220, 1967.

MAZZONETO, F. Efeito de genótipos de feijoeiro e de pós de origem vegetal sob o controle de *Zabrotes subfasciatus* (BOH) e *Acanthoscelides obtectus* (SAY) (COL: BRUCHIDAE). Tese (doutorado). Piracicaba: Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz. 2002.134p.

MILACH, S.C.K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S.C.K. (ed). *Marcadores Moleculares em Plantas*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 17-40. 1998.

MORK, J. *Methods in population genetics*. Department of Botany & Trondhjem Biological Station. 2000. Disponível em: <http://folk.ntnu.no/vmbijmor/jmork/courses/315H02/00Komp.doc>. Acesso em: 15 de janeiro de 2007.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proceedings National Academy of Sciences*, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, v. 83, p. 583– 590, 1978.

OLIVEIRA, J. V., RAMALHO, M. A. P. e D. BARDIN. Avaliação dos prejuízos em feijões *Vigna sinensis* (L.) Savi e *Phaseolus vulgaris* (L.) devido ao ataque de *Zabrotes subfasciatus* (Boh.,1833) (Coleoptera, Bruchidae). *Ecossistema*, v. 2, p. 19-22, 1977.

PACHECO, I.A., CESAR DE PAULA, D. Insetos de grãos armazenados- Identificação e Biologia. Campinas: Fundação Cargill. 228p. 1995.

PADIL (*Pestes and Diseases Image Library*). *Zabrotes subfasciatus*. Disponível: <http://www.padil.gov.au/viewPestDiagnosticImages.aspx?id=129>. Acesso em: 03 de dezembro de 2006.

PEDRA J.H.F., BRANDT A., WESTERMAN S., LOBO N., HIT H-M, *et al.* Transcriptome analysis of the cowpea weevil bruchid: identification of putative proteinases and  $\alpha$ -amylases associated with food breakdown. *Insect Molecular Biology*, v. 12, n. 4, p. 405-412, 2003.

PEREIRA, P.A.A., YOKOYAMA, M., QUINTELA, E.D., BLISS, F. Controle de caruncho *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1833) (Coleoptera-Bruchidae) pelo uso de proteína da semente em linhagens quase-isogênicas do feijoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 30, n. 8, p. 1031-1034, 1995.

PIMBERT, M.; PIERRE, D. Ecophysiological aspects of bruchid reproduction. I. The influence of pod maturity and seeds of *Phaseolus vulgaris* and the influence of insemination on the reproductive activity of *Zabrotes subfasciatus*. *Ecological Entomology*, v. 8, p. 87- 94, 1983.

REDDY, M.P; SARLA, N.; REDDY, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application plant breeding. *Euphytica*, v. 128, p. 9-17, 2002.

REES, D.P. Coleoptera. In: Integrated Management of insects in stored products. SUBRAMANYAM, B., HAGSTRUM, D.W (ed). New York: Marcel Dekker, cap. 1, p. 1-11, 1996

ROHLF, F.J. *NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. New York: Exeter, Software. 2005.

ROSOLEM, C.A., MARUBAYASH, O.M. Seja o doutor do seu feijoeiro. *Arquivo do Agrônomo- POTAFOS*, 1994.

SAKAI A.K., ALLENDORF F.W., HOLT J.S. *et al.* The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 32, p. 305-332, 2001.

SALES, M.P., ANDRADE, L.B., ARY, M.B. *et al.* Performance of bean bruchids *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) reared on resistant (IT81D-1045) and susceptible (Epace 10) *Vigna unguiculata* seeds: relationship with trypsin inhibitor and vicilin

excretion. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, Molecular and Integrative Physiology* v. 142, n. 4, p. 422– 426, 2005.

SARI, L.T., RIBEIRO-COSTA, C.S., PEREIRA, P.R.V.S. Aspectos biológicos de *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann,1833) (Coleoptera, Bruchidae) em *Phaseolus vulgaris* L., cv. Carioca (Fabaceae), sob condições de laboratório. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 47, n. 4, p. 621-624, 2003.

SCHOONHOVEN, A.V., CARDONA, C. Low levels of resistance to the Mexican Bean Weevil, *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) in dry beans. *Journal Economy Entomology*, v. 75, p. 567-569, 1982.

SHANNON, CLAUDE E.; WEAVER, WARREN. *A Mathematical Model of Communication*. Urbana, IL: University of Illinois Press. 1949.

SHELLIE-DESSERT, K.C., BLISS, F.A. Genetic improvement of food quality factors. In: SCHOONHOVEN, A. van, VOYSEST, O. (ed). *Common beans: research for crop improvement*. Colombia: Ciat (Centro Internacional de Agricultura Tropical), cap. 12, p. 649-677. 1991.

SOUTHGATE, B. J. Biology of the Bruchidae. *Annual Review of Entomology*, v. 24, n. 1, p. 449-473, 1979.

VIEIRA, C. Doenças e pragas do feijoeiro. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1983. 206p.

WIENDL, F.M. A desinfestação de grãos e produtos armazenados por meio de radiação ionizante. *Bol. Divulg.*,v. 18, CENA-USP, Piracicaba, SP, 26p. 1975.

WOLFE, A.D. ISSR techniques for evolutionary biology. *Methods in Enzimology*, v. 395, p. 134-144, 2005.

YEH, F.C., YANG, R., BOYLE, T. POPGENE version 1.3: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. 1999.

YOKOYAMA, M. Pragas. In: Feijão. VIEIRA C., PAULA JUNIOR. T.J., BORÉM A. (ed). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, cap. 12, p. 341-357. 2006.

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

ZIMMERMAN, M.J., TEIXEIRA, M.G. Origem e evolução. 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. 79-85. 1988.