

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**FILOGEOGRAFIA MOLECULAR, DIVERSIDADE GENÉTICA E TOXICIDADE
A FOSFINA EM POPULAÇÕES DE CARUNCHO-DO-MILHO (*Sitophilus
zeamais*).**

Alberto Soares Corrêa
Doctor Scientiae

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

ALBERTO SOARES CORRÊA

**FILOGEOGRAFIA MOLECULAR, DIVERSIDADE GENÉTICA E TOXICIDADE
A FOSFINA EM POPULAÇÕES DE CARUNCHO-DO-MILHO (*Sitophilus
zeamais*).**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

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

T

C824f
2012

Corrêa, Alberto Soares, 1983-

Filogeografia molecular, diversidade genética e toxicidade a
fosfina em populações de caruncho-do-milho
(*Sitophilus zeamais*) / Alberto Soares Corrêa. – Viçosa, MG,
2012.

x, 108f. : il. ; (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Sitophilus zeamais*. 2. Evolução molecular.
3. Marcadores genéticos. 4. Toxicologia. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 595.768

ALBERTO SOARES CORRÊA

**FILOGEOGRAFIA MOLECULAR, DIVERSIDADE GENÉTICA E TOXICIDAD
A FOSFINA EM POPULAÇÕES DE CARUNCHO-DO-MILHO (*Sitophilus
zeamais*).**

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

APROVADA: 21 de Setembro de 2012



Luiz Orlando de Oliveira
(Coorientador)



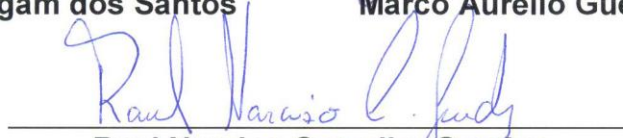
Christina Cleo Vinson
(Coorientadora)



Jorge A. Dergam dos Santos



Marco Aurélio Guerra Pimentel



Raul Narciso Carvalho Guedes
(Orientador)

À meus pais, Euro (*in memoriam*) e Norma, meus exemplos;
À minha irmã Dayana;
À Julia, meu grande amor;
Aos meus amigos, verdadeiros companheiros de batalha;
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Criador que concedeu a dádiva da vida, a força e a sabedoria necessária para essa jornada.

A Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, ao CNPq pela concessão da bolsa e a todo povo brasileiro que contribuíram diretamente e indiretamente na minha formação, na oportunidade de aprofundamento científico e na conclusão deste trabalho. Também agradeço à FAPEMIG e a CAPES pela concessão recursos e de outras bolsas a professores e estudantes de graduação e pós-graduação que contribuíram diretamente ou indiretamente na elaboração da tese.

Ao Professor Raul Narciso Carvalho Guedes, pela confiança depositada e pela orientação amigável, enriquecedora e presente durante estes 10 anos de entomologia; Muito Obrigado!

Aos conselheiros, Professor Luiz Orlando de Oliveira e à Dra Christina Cleo Vinson pela imprescindível ajuda, paciência e conselhos durante o Doutorado;

Aos amigos do laboratório de Ecotoxicologia: Prof Eliseu, Prof Eugênio, Nelsa, Altair, Lessando, Luciana, Érick, Julio, Ronnie, Wagner, Sharrine, Katherine, Eduardo, Daiane, Danúbia e Conrado pela convivência maravilhosa e enriquecedora, e principalmente ao Lucas, Gislaine e Hudson pela grande e essencial ajuda nos ensaios realizados na confecção desta tese;

Também, aos amigos do laboratório de Sequenciamento e Biologia Molecular: Márcia, Roberta, Magali, Ana, Érica, Juliana, Vanderson, Thaís, Amanda, Rafa, Larissa, Hugo, Thamyres e Alexander pela paciência e amizade durante a realização da tese.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Entomologia, cuja orientação nas disciplinas me possibilitou a abertura de novos conhecimentos e horizontes científicos. Principalmente ao Professor Marcelo Picanço e a toda a equipe do laboratório de Manejo Integrado de

Pragas pela grande amizade e valiosa e presente ajuda em momentos de adversidade;

A todos os meus amigos (essa grande família, importantíssimos nesta jornada) do inesquecível alojamento 1421, de Sem Peixe, do lendário Santa Cana (sem exagero!), da Agronomia e da Entomologia, pela convivência, brincadeiras, estudos e cervejinhas do dia-a-dia;

A toda minha família, primos, tios e avós, sempre presentes na minha vida;

A minha irmã Dayana pelo carinho e apoio incondicional durante os anos de Viçosa;

A Julia pelo amor, carinho, paciência e força depositados durante esses quase sete anos de convivência;

E agradeço principalmente aos meus pais Euro e Norma que sempre acreditaram que o estudo é a maior herança que poderiam deixar aos seus filhos, algo que pode ser desfrutado por toda a vida.

BIOGRAFIA

Alberto Soares Corrêa, filho de Euro José Lelis Corrêa e de Norma Aparecida Soares Corrêa, nascido no dia 05 de janeiro de 1983, no município de Viçosa, em Minas Gerais, Brasil.

Começou sua carreira acadêmica em 1999 quando ingressou no Colégio Agrícola Nilo Peçanha em Pinheiral - RJ, formando-se Técnico Agrícola no ano de 2002.

Em maio de 2002 ingressou na Universidade Federal de Viçosa, iniciando o curso de Agronomia. Realizou estágios no Departamento de Engenharia Agrícola sob Orientação de Dra Lêda D'Antonino Faroni e no Departamento de Biologia Animal, especificamente no laboratório de Ecotoxicologia, onde foi bolsista de iniciação científica da FAPEMIG durante o período de três anos (2004 a 2007) sob orientação de Dr. Raul Narciso Carvalho Guedes, graduando-se Engenheiro Agrônomo em março de 2007.

Em março de 2007 iniciou o curso de mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, sob a orientação do Professor Raul Narciso Carvalho Guedes, submetendo-se à defesa aos 16 de fevereiro de 2009. Em seguida, em Março de 2009 ingressou no Doutorado no mesmo programa, defendendo a tese no dia 21 de setembro de 2012.

ÍNDICE

	Pág.
Resumo	vii
Abstract	ix
Revisão de Literatura	01
Referências Bibliográficas	09
Objetivo Geral	17
Capítulo 1: Distribuição das espécies relacionadas de carunchos, <i>Sitophilus oryzae</i> e <i>S. zeamais</i> , no Brasil	18
1. Introdução	19
2. Material e Métodos	20
3. Resultados	25
4. Discussão	25
5. Referências Bibliográficas	29
Capítulo 2: Caracterização e transferabilidade de marcadores de microssatélites para as espécies-praga do gênero <i>Sitophilus</i> (Coleoptera: Curculionidae)	34
1. Introdução	35
2. Material e Métodos	35
3. Resultados e Discussão	37
4. Referências Bibliográficas	41
Capítulo 3: Evidências moleculares revelam recente colonização global do caruncho-do-milho, <i>Sitophilus zeamais</i> (Coleoptera: Curculionidae)	44
1. Introdução	45
2. Material e Métodos	46
3. Resultados	55
4. Discussão	73
4. Considerações finais	78
5. Referências Bibliográficas	79

Capítulo 4: Linhagens mitocondriais, lise mitocondrial e taxa respiratória são associadas com susceptibilidade a fosfina em populações brasileiras de caruncho-do-milho, <i>Sitophilus zeamais</i> ?.....	87
1. Introdução	88
2. Material e Métodos	90
3. Resultados	93
4. Discussão	98
5. Referências Bibliográficas	101
Conclusão Geral	107

RESUMO

CORRÊA, Alberto Soares, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Setembro de 2012. **Filogeografia molecular, diversidade genética e toxicidade a fosfina em populações de caruncho-do-milho (*Sitophilus zeamais*)**. Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes. Coorientadores: Luiz Orlando de Oliveira, Christina Cleo Vinson e Eliseu José Guedes Pereira.

Os carunchos são responsáveis pelas principais perdas ocorridas nos cereais e seus subprodutos durante o armazenamento. *Sitophilus zeamais*, o caruncho-do-milho, é a principal praga do milho armazenado no mundo e apesar de intensos estudos sobre sua biologia e controle, a sua atual distribuição geográfica ainda é pouco esclarecida e quando se trata dos fatores históricos e contemporâneos que moldaram a atual distribuição desta espécie-praga no Brasil e no mundo, as informações são ainda mais escassas. *Sitophilus zeamais* e *S. oryzae* (caruncho-do-arroz) são espécies irmãs e apresentam grande similaridade morfológica e ecológica, o que proporciona sérios erros de identificação. Desta forma, no presente estudo desenvolvemos com sucesso primers espécie-específicos para inferir a distribuição geográfica real do caruncho-do-milho no Brasil. Após a confirmação da ampla distribuição e ocorrência do *S. zeamais* em todo o território brasileiro, o que reafirma o status de principal caruncho-praga de cereais armazenados no país, nós realizamos estudos moleculares sobre a estrutura genética populacional com uma abordagem filogeográfica, para determinar a importância dos fatores históricos e causas ecológicas contemporâneas que moldaram a arquitetura genética das populações de caruncho-do-milho presentes no Brasil. Para isso, utilizamos dados de sequenciamento de fragmentos de dois genes mitocondriais, COI e COII de diversos indivíduos de *S. zeamais* divididos em 55 locais de coleta espalhados pelo mundo. Também construímos e utilizamos dados de marcadores microssatélites no intuito de inferir sobre a diversidade genética e estrutura populacional recente desta espécie e apoiar os dados de sequenciamento. Nossos resultados apontaram que as populações de caruncho-do-milho apresentam um cenário de expansão espacial. Contudo,

não foi possível traçar hipóteses a respeito da dispersão histórica do caruncho-do-milho no Brasil e mundo, possivelmente pelas populações desta espécie serem oriundas de múltiplos e constantes eventos de migração populacional. Os dados de microssatélites apontaram moderada divergência populacional entre os locais de coleta e baixa divergência entre os locais de coleta dentro do mesmo grupo, o que confirma a presença de fluxo genético entre as áreas de plantios e estocagem de grãos. Este fluxo genético é maior em áreas mais próximas geograficamente, no entanto o fluxo genético pode ocorrer entre regiões distantes até mesmo entre diferentes continentes, possivelmente pelo transporte de grãos infestados por fases imaturas do inseto. As características aqui relatadas das populações de caruncho-do-milho são bastante preocupantes para os programas de manejo integrado desta espécie praga e devem ser seriamente consideradas em programas de manejo da resistência a inseticidas, pois a variabilidade dentro das populações é alta e o fluxo gênico entre regiões produtoras é constante o que pode levar a migração de alelos de resistência. Fosfina é um fumigante amplamente aplicado em armazéns brasileiros e o seu mecanismo de toxicidade e resistência ainda é pouco esclarecido. No entanto o principal sítio de ação da fosfina é a mitocôndria, desta forma aproveitando a confirmada utilidade dos genes mitocôndrias com marcadores populacionais, tentamos correlacionar susceptibilidade a fosfina nas populações brasileiras de caruncho-do-milho com haplótipos mitocondriais. Nossos resultados não apontam nenhuma estrutura genética dos genes mitocondriais em indivíduos de *S. zeamais* que poderia ser relacionada a susceptibilidade à fosfina. No entanto, populações com maior sobrevivência frente a aplicação da fosfina apresentam menor taxa respiratória e aparentemente maior densidade de mitocôndrias em células musculares.

ABSTRACT

CORRÊA, Alberto Soares, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2012. **Molecular phylogeography, genetic diversity and phosphine toxicity in maize weevil populations (*Sitophilus zeamais*).** Adviser: Raul Narciso Carvalho Guedes. Co-advisers: Luiz Orlando de Oliveira, Christina Cleo Vinson and Eliseu José Guedes Pereira.

Weevils are responsible for major losses occurring in cereals and their subproducts during storage. *Sitophilus zeamais*, the maize weevil, is the main pest of stored maize in the world and despite intensive studies on its biology and control, its current geographic distribution remains unclear. When it comes to the historical and contemporary factors that shaped the current distribution of this pest in Brazil and in the world, the information are still scarce. *Sitophilus zeamais* and *S. oryzae* (the rice weevil) are sister species and exhibit great morphological and ecological similarity, which leads to serious mistakes of identification. Thus, the present study successfully developed species-specific primers to infer the geographical distribution of the maize weevil in Brazil. After confirming the widespread distribution and occurrence of *S. zeamais* throughout the Brazilian territory, which reaffirms its status of major pest of stored grains in the country, we performed molecular studies on the population genetic structure with a phylogeographic approach to determine the importance of historical factors and ecological causes that have shaped the present and contemporary genetic architecture of the maize weevil populations of Brazil. For this, we used data sequencing fragments of two mitochondrial genes, COI and COII, of several individuals of *S. zeamais* divided into 55 collection sites around the world. We also made and used data from microsatellite markers in order to infer the genetic diversity and population structure of this species and support the sequencing data. Our results showed that the populations of the maize weevil are in spatial expansion. However, it was not possible to draw assumptions about the historical dispersion of the maize weevil in Brazil and the world, probably because the populations of this species are derived from multiple events and constant migration. The microsatellite data showed

moderate population divergence among the sampling sites, and low divergence between the sampling sites within the same group, which confirms the presence of gene flow between plantations and storage grain sites. The findings reported here regarding the maize weevil populations are a concern for this species integrated management and should be seriously considered in management programs of insecticide resistance due to the high variability within populations and the constant gene flow between regions, which can lead to the spread of resistance alleles. Phosphine is a fumigant widely used in Brazilian storage units and its mechanism of toxicity and resistance remains poorly understood. However the main phosphine site of action is the mitochondria. Therefore, taking advantage of the usefulness of the mitochondrial genes COI e COII as population markers, we assessed the potential correlation between phosphine toxicity of Brazilian populations of maize weevil and their mitochondrial haplotypes. Our results do not indicate any genetic structure of mitochondrial genes in *S. zeamais* individuals that could be related to phosphine susceptibility. However populations with increased phosphine survival show apparently lower respiration rate and higher density of mitochondria in muscle cells.

REVISÃO DE LITERATURA

Uma ampla variedade de insetos pode ser encontrada em produtos estocados pelo homem, estes são denominados insetos-praga de produtos armazenados. Perdas durante a fase de pós-colheita são reconhecidamente elevadas e irrecuperáveis por se tratar do produto final. *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855, *Sitophilus oryzae* (L., 1763) e *Sitophilus granarius* (L., 1758) são insetos-praga de produtos armazenados conhecidos como carunchos (caruncho-do-milho, caruncho-do-arroz e caruncho-do-trigo, respectivamente). Carunchos são popularmente definidos como insetos xilófagos capazes de perfurar madeira e sementes reduzindo-os a pó. Durante o armazenamento estes besouros encontram condições ideais de sobrevivência e reprodução devido à grande disponibilidade de alimento, abrigo e temperaturas favoráveis, provocando assim sérias perdas quantitativas e qualitativas como redução da massa de grãos, contaminação, depreciação e inviabilização para consumo humano e animal (Guedes 1991; Rees, 1996; Santos & Montovani, 1997; Danho et al., 2002).

Acredita-se que os principais carunchos de produtos armazenados têm como origem ancestral insetos que atacavam o cerne e as sementes de árvores de grande porte (Delobel & Grenier, 1993). Desta forma, sua associação com os cereais, e conseqüente status de praga, está diretamente relacionada com o início do cultivo de cereais pelo homem, visto que, através das atividades antrópicas, relacionadas ao desenvolvimento da agricultura, houve aumento do tamanho das sementes dos cereais cultivados (ver Plarre, 2010). Especificamente, o gênero *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae) possui origem no continente Asiático e contém 14 espécies descritas (Delobel & Grenier, 1993; Obata et al., 2011), mas apenas *S. zeamais*, *S. oryzae* e *S. granarius* são pragas de produtos armazenados. *Sitophilus lineares* é fortemente relacionada ao seu hospedeiro, o tamarindo (*Tamarindus indica*, Caesalpiniaceae), e já foi relatada no norte e nordeste brasileiro associado a plantios comerciais de tamarindo (Arthur & Arthur, 2006). Já as demais espécies como *S. glandium*,

S. rugicollis, *S. rugosus*, *S. sculpturatus* e *S. vateriae* são descritas atacando sementes de diversas árvores em florestas temperadas e subtropicais da região oriental do continente asiático, mas possuem a biologia muito pouco conhecida e explorada (Kaushal et al., 1993; Nardon et al., 2002; Plarre, 2010).

Biologia

Os carunchos do gênero *Sitophilus* são considerados pragas primárias por atacarem o grão intacto e possuem grande poder destrutivo quando infestam cereais (milho, trigo, arroz, sorgo) e seus produtos processados secos como macarrão e biscoitos (Hagstrum et al., 1996). Os indivíduos adultos iniciam a infestação no campo (Adda et al., 2002; Brown & Lee, 2002) e apresentam grande autonomia de voo, com exceção do *S. granarius* que não é capaz de voar (Hagstrum et al., 1996). A dispersão ocorre a grandes distâncias principalmente pelo transporte de grãos contaminados, e a pequenas distâncias por insetos adultos que se locomovem entre regiões produtoras (Rees, 1996).

As fêmeas, com suas mandíbulas, abrem orifícios no grão para alimentação e postura dos ovos. Estes são colocados individualmente nos orifícios que posteriormente são lacrados com uma substância clara e pegajosa produzida pelo próprio órgão ovipositor da fêmea (Evans, 1981). Durante os 4-6 meses de vida adulta, a fêmea coloca cerca de 150 ovos. As formas jovens se desenvolvem durante todo o seu ciclo (ovo-pupa) no interior do grão utilizando-o como alimento e abrigo, caso exista mais de uma larva por grão, o canibalismo é extremamente frequente (Evans, 1981; Danho et al., 2002; Guedes et al., 2010). O ciclo de vida das espécies-praga do gênero *Sitophilus* varia de 30-40 dias, com sete gerações médias por ano. Os indivíduos machos adultos possuem feromônio de agregação, o que torna os insetos de hábito gregário, com forte sobreposição de gerações e com alta taxa de endogamia. O desenvolvimento da fase jovem no interior do grão, aliado a alimentação constante do adulto durante todo o ciclo, podem levar perdas de até 50% do total do peso grão estocados. O ataque

é notadamente mais acentuado em regiões com temperatura mais elevadas, visto que as condições ótimas de desenvolvimento são em torno de 28 °C e 70% de umidade relativa do ar (Rees, 1996).

As espécies do gênero *Sitophilus* são modelos de estudos que envolvem alterações metabólicas provocadas pela relação simbiótica hospedeiro-bactéria (Heddi et al., 1993; 1998; 1999; 2001). Simbiontes intracelulares, ou endossimbiontes, são umas das mais sofisticadas interações mutualísticas entre células eucariotas e organismos intracelulares (Heddi et al., 1999). Estas interações merecem bastante atenção em insetos que possuem dieta restrita como os carunchos de produtos armazenados, pois os endossimbiontes são responsáveis por produzir aminoácidos essenciais para o metabolismo basal dos insetos (Heddi et al., 1999; 2001). Alguns estudos demonstraram que bactérias endossimbiontes fornecem a seus hospedeiros ácido pantotênico, biotina e riboflavina, além de três vitaminas essenciais envolvidas no ciclo de Krebs e na cadeia transportadora de elétrons (Wicker, 1983). Simbiontes também estão envolvidos em características da história de vida dos carunchos como fertilidade, tempo de desenvolvimento e até mesmo na capacidade de vôo (Heddi et al., 2001). Nas três espécies pragas do gênero *Sitophilus* (*S. zeamais*, *S. oryzae* e *S. granarius*) são descritos dois tipos de simbiontes intracelulares. O principal deles é o SOPE (Endossimbionte Primário de *Sitophilus oryzae* – identificado inicialmente em *S. oryzae*), que é uma γ -proteobactéria. Este endossimbionte está presente em todas as linhagens de carunchos-praga de grãos armazenados estudados até o momento, participando diretamente do metabolismo do hospedeiro e é localizado em todos os tecidos do inseto em células específicas conhecidas como bacteriocitos (Heddi et al., 2001). Já a *Wolbachia* (α -Proteobactéria) é um simbiote facultativo, apesar de influenciar diretamente a reprodução do organismo. Esta bactéria também é disseminada em todos os tecidos do organismo, no entanto se concentra em células germinativas onde pode causar incompatibilidade nucleocitoplasmática (Heddi et al., 1999). A coexistência independente destas duas bactérias intracelulares mostra

diferentes níveis de integração com a biologia do hospedeiro e ilustra a complexidade genética do sistema *Sitophilus*-simbiontes.

Taxonomia e Filogenia

Os carunchos do gênero *Sitophilus* são coleópteros da família Curculionidae e da subfamília Dryophthotidae, esta compreendendo cerca de 140 gêneros. Estes insetos apresentam características morfológicas marcantes como rostro alongado onde estão inseridas as peças bucais, tamanho do corpo com 2,5 a 4 mm de comprimento e coloração castanho-escura. O protórax está densamente coberto de depressões circulares ou ligeiramente ovaladas. As três espécies pragas do gênero *Sitophilus* são bastante similares morfológicamente, no entanto *S. granarius* é facilmente distinguido de *S. zeamais* e de *S. oryzae* pela ausência de manchas amareladas nos élitros e pela incapacidade de voo devido à fusão dos élitros (Rees, 1996). Já *S. zeamais* e *S. oryzae* apresentam características morfológicas muito similares, e são frequentemente identificadas de maneira errada. Não existe chave para identificação correta de *S. zeamais* e *S. oryzae* pela morfologia externa. Até o presente momento a identificação mais utilizada para as duas espécies são mínimas diferenças morfológicas na genitália masculina e feminina (Floyd & Newsom, 1959; Kuschel, 1961; Halstead, 1963).

As análises filogenéticas que buscam esclarecer as relações entre as espécies de *Sitophilus* ainda não foram muito bem elaboradas ou explicadas (Plarre, 2010). Apesar disso, estudos filogenéticos com espécies da subfamília Dryophthotidae enquadram as espécies *Sitophilus* como um ramo monofilético dentro deste grupo (O'Mera, 2001). Também existe um alto nível de semelhança genética entre as linhagens do simbiote SOPE entre as espécies, o que sugere um único evento evolutivo de simbiose, o que significaria que *S. granarius*, *S. oryzae*, *S. rugicollis*, *S. zeamais* e, possivelmente, *S. vateriae* poderiam ser originalmente uma única espécie infectada ancestralmente por uma estirpe de SOPE (Heddi et al., 2001; Lefèvre et al., 2004; Conord et al., 2008; Plarre, 2010). Apesar de *S.*

granarius, *S. oryzae* e *S. zeamais* possuem morfologia muito similar, *S. oryzae* e *S. zeamais* são morfologicamente quase indistinguíveis e já foram consideradas raças da mesma espécie, possuem capacidade de acasalar e produzir prole, no entanto a prole é um híbrido infértil, por isso essas duas espécies são consideradas irmãs (Birch, 1944; Floyd & Newsom 1959). No entanto, um trabalho realizado por O'Meara (2001) com 26 espécies da subfamília Dryophthorinae utilizando três genes, citocromo c oxidase subunidade I, fator de alongação e 28S apresentou resultado contraditório descrevendo como espécies irmãs *S. granarius* e *S. zeamais*. Entretanto, através de parâmetros morfológicos, ecológicos e mais recentemente moleculares, existe um consenso que o *S. zeamais* e *S. oryzae* são mais próximos em relação a *S. granarius*.

Distribuição e hospedeiro

O gênero *Sitophilus* tem origem asiática e a maioria das espécies ainda estão restritas ao continente de origem com exceção do *S. linearis*, que é associado ao tamarindo, e das três espécies-praga de cereais armazenados, *S. zeamais*, *S. oryzae* e *S. granarius* (Plarre, 2010). Os carunchos-praga tem ampla distribuição sendo encontrados em todas as regiões produtoras de cereais do mundo. *Sitophilus granarius* é a espécie-praga com menor distribuição entre as três espécies de carunchos-praga, sendo restrito apenas ao mediterrâneo, Europa central e regiões de clima temperado na Ásia, América e Austrália. Já *S. zeamais* e *S. oryzae* são encontrados em todas as regiões produtoras de cereais do mundo, no entanto parece existir um maior *fitness* do *S. zeamais* em climas quentes e úmidos e de *S. oryzae* em climas mais moderados (Longstaff, 1981).

Os carunchos são capazes de atacar todas as espécies de cereais cultivadas não sendo restritos a nenhum hospedeiro, apesar da denominação comum dos carunchos induzirem a este tipo de erro. No entanto, existem relatos na literatura de que o caruncho-do-milho (*S. zeamais*) é mais adaptado a grãos de milho e o caruncho-do-arroz (*S. oryzae*) a grãos de trigo e arroz (Longstaff, 1981). No entanto, até o

presente momento nenhum estudo foi realizado com intuito de prever a distribuição e a dispersão histórica dessas espécies-pragas em uma escala global. O caso mais peculiar é do *S. zeamais* que apresenta como principal hospedeiro o milho, devido a este ser o único cereal que não possui sua origem no continente asiático e sim americano, mais especificamente mesoamericano (Dickau et al., 2007; Piperno et al., 2009). Desta forma, esforços ainda são necessários para entender a história evolutiva e as implicações dos eventos naturais e de ações humanas na dispersão destas espécies de gorgulhos (Buckland, 1981).

Controle

A utilização de inseticidas é o principal método empregado para o controle de insetos-praga de produtos armazenados, devido à sua simplicidade de implantação, alta eficiência e baixo custo (Guedes, 1991; Braga et al., 2001; White & Leesch, 1996). Existem duas categorias de inseticidas para o controle químico de pragas de produtos armazenados: os inseticidas fumigantes e os inseticidas protetores. Fosfina (PH_3) é o principal composto inseticida utilizado como fumigante para o controle de pragas de produtos armazenados a partir da década de 1980, principalmente com a proibição do brometo de metila (Benhalima et al., 2004). A fosfina apresenta características vantajosas como amplo espectro de ação, rápida difusão, baixo custo e mínima ação residual após sua liberação na atmosfera (Chaudhry, 2000; Wang et al., 2006). A fosfina tem poder curativo, pois devido a suas propriedades físico-químicas possui a capacidade de penetrar nos grãos e atingir todas as fases do ciclo de vida dos insetos. Em contraste, os inseticidas protetores têm como objetivo impedir a infestação inicial dos grãos, visto que possuem a capacidade de controlar os insetos adultos, mas mostram efeito residual provendo controle por período prolongado de tempo (da ordem de meses)

Historicamente, no Brasil, o principal composto utilizado como inseticida protetor de grãos armazenados foi a dicloro-difenil tricloroetano (DDT). Contudo, com a proibição da utilização deste composto para fins

agrícolas em meados da década de 80, novos compostos passaram a serem utilizados, com destaque para os inseticidas pertencentes aos grupos dos organofosforados e piretróides (Guedes, 1990; Braga et al., 1991; Guedes et al., 1995) e mais recentemente misturas advindas destes compostos (Corrêa et al., 2011).

Esforços têm sido constantemente empregados na elaboração de métodos alternativos ao controle químico devido a problemas de resíduos indesejáveis na massa de grãos, intoxicação de operadores, contaminação do ambiente e problemas de falhas de controle devido a resistência a inseticidas por insetos-praga (Guedes, 1991). Vários métodos alternativos podem ser citados (ver Faroni et al., 2001; Gudrups et al., 2001; Collins & Cook, 2006; de Oliveira et al., 2007; Souza et al., 2008; Velten et al., 2008), no entanto ainda não são empregados em grande escala. A utilização da terra de diatomácea e atmosfera modificada são dois métodos com grande potencial de utilização, mas encontram grandes entraves devido à necessidade de adaptações estruturais nos armazéns. Já programas de melhoramento de plantas e controle biológico são métodos alternativos ao controle químico utilizados de maneira bastante eficiente em vários programas de manejo integrado de pragas. No entanto, no caso de carunchos de grãos armazenados estes métodos ainda são falhos e carecem de informações sobre a história evolutiva dos hospedeiros e dos inimigos naturais e a integração destas com as espécies-praga. Além disso, informações sobre a estrutura genética, distribuição espacial e temporal, bem como a influência dos fatores ecológicos e antrópicos na dinâmica populacional destas pragas, importantes para a sustentabilidade de programas de manejo, são extremamente restritas e pobres.

Resistência a inseticidas

A resistência a inseticidas se traduz em mecanismos que são resultado de alterações genômicas apresentadas por alguns organismos possibilitando a sua sobrevivência frente a doses letais de inseticidas para a maioria dos indivíduos de uma população normal da mesma espécie. A

resistência a inseticidas se desenvolve mediante a seleção de indivíduos raros na população que conseguem sobreviver à ação destes compostos nas doses utilizadas. Portanto, o fenômeno da resistência é pré-adaptativo e não de efeito mutacional (Brattsten *et al.*, 1986). Resistência a piretróides e ao fumigante fosfina foi constatada principalmente em populações de *S. zeamais* (caruncho-do-milho) em várias regiões do Brasil e do mundo comprometendo seriamente o controle deste inseto-praga e trazendo grandes prejuízos a armazéns de grãos (Perez-Mendonza, 1999; Ribeiro *et al.*, 2003; Pimentel *et al.*, 2009; Corrêa *et al.*, 2011).

Toxicidade a fosfina é dependente da respiração aeróbica, no entanto os mecanismos de toxicidade ainda são pouco entendidos. Existem fortes evidências de que a fosfina interrompe o metabolismo energético da célula. Desta forma, a mitocôndria é um dos principais sítios de ação da fosfina. Estudos *in vitro* com mitocôndrias isoladas revelaram que a citocromo c oxidase (complexo IV) da cadeia transportadora de elétrons é fortemente inibida pela fosfina (Chefurka *et al.*, 1976; Nakakita, 1976). Já os mecanismos de resistência a fosfina são ainda menos conhecidos (Valmas, *et al.*, 2008; Zuryn *et al.*, 2008). Resistência à fosfina inicialmente parece não estar ligada a alterações bioquímico-fisiológicas na citocromo c oxidase (Price, 1980). Recentes estudos com coleópteros-praga, incluindo *S. zeamais*, demonstraram que a produção de dióxido de carbono está correlacionada negativamente com a sobrevivência à fosfina indicando uma relação direta entre o metabolismo destes insetos e a sensibilidade ao fumigante (Pimentel *et al.*, 2007, 2009). Nakakita (1987) descreveu o comportamento narcótico de alguns insetos pragas como um dos principais fatores de resistência à fosfina. Esse modelo de comportamento sugere que, em altas concentrações de fosfina, ocorre uma diminuição da captação de oxigênio pelos insetos, onde a citocromo c oxidase deixa o estado reduzido ficando menos sensível a este fumigante.

Piretróides são inseticidas neurotóxicos que agem diretamente nos neurônios, mais especificamente no axônio mantendo os canais de sódio abertos provocando hiperexcitação neural e conseqüente mau

funcionamento de músculos, órgãos e posteriormente a morte do organismo (Narahashi, 2000). Resistência a piretróides e DDT está principalmente ligada à insensibilidade do sítio de ação (canal de sódio) da molécula inseticida. Este mecanismo de resistência é conhecido como resistência *knockdown* (*kdr*), e é causada por modificações (mutações pontuais) na proteína *para* do canal de sódio, fazendo com que esta seja menos sensível ao efeito tóxico dos piretróides e DDT (Miyazaki et al., 1996; Williamson et al., 1996; Dong, 1997). A resistência *kdr* pode causar uma redução de 10-20 vezes na sensibilidade do sítio de ação desses compostos e é provavelmente o mais importante dos mecanismos de resistência descrito em insetos (Hemingway & Ranson, 2000). Especificamente no caruncho-do-milho (*Sitophilus zeamais*), *kdr* foi recentemente identificado por Araujo et al. (2011). Estes autores demonstraram que a mutação C/T na região do domínio II (DIIS4-DIIS6) do gene *para* de canal de sódio de indivíduos resistentes resultou na substituição de treonina para uma isoleucina na posição 929 da proteína (T929I, *Drosophila*), dando origem a mutação *super-kdr* e alto níveis de resistência a DDT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adda, C.; Borgemeister, C.; Meikle, W.G.; Markhaam, R.H.; Poehling, H.M. Integrated pest management in post-harvest maize: a case study from the Republic of Togo (West Africa). *Agriculture, Ecosystems & Environment* 93, 305-321, 2002.
- Araujo, R.A.; Williamson, M.S.; Bass, C.; Field, L.M.; Duce, I.R. Pyrethroid resistance in *Sitophilus zeamais* is associated with a mutation (T929I) in the voltage-gated sodium channel. *Insect Molecular Biology* 20, 437-445, 2011.
- Arthur, V.; Arthur, B.P. Controle de *Sitophilus linearis* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) em *Tamarindus indica* através da radiação gama Cobalto 60. *Biologia sanitaria e veta plagas*, 23, 121-124, 2006.

- Benhalima, H.; Chaudhry, M.Q.; Mills, K.A.; Price, N.R. Phosphine resistance in stored-product insects collected from various grain storage facilities in Morocco. *Journal of Stored Products Research* 40, 241–249, 2004.
- Birch, L.C. Two strains of *Calandra oryzae* L. (Coleoptera). *Australian Journal of Zoology* 2, 66-74, 1944.
- Braga, L.S.; Corrêa, A.S.; Pereira, E.J.G.; Guedes, R.N.C. Face or Flee? Fenitrothion resistance and behavioral response in populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research* 47, 161-167, 2011.
- Brattsten, L.B.; Holyoke Jr., C.W.; Leeper, J.R.; Raffa, K.F. Insecticide resistance: challenge to pest management and basic research. *Science* 231, 1255-1260, 1986.
- Brown, S.L.; Lee, R.D. Effect of planting data, variety and degree of ear maturation on the colonization of field corn by maize weevils (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Entomological Science* 37, 137-142, 2002.
- Buckland, P.C. The early dispersal of insect pests of stored products as indicated by archaeological records. *Journal of Stored Products Research* 17, 1–12, 1981.
- Chaudhry, M.Q. Phosphine resistance. *Pesticide Outlook* 11, 88–91, 2000.
- Chefurka, W.; Kashi, K.P.; Bond, E.J. The effect of phosphine on electron transport in mitochondria. *Pesticide Biochemistry Physiology* 6, 65–84, 1976.
- Conord, C.; Despres, L.; Vallier, A.; Balmand, S.; Miquel, C.; Zundel, S.; Lemperiere, G.; Heddi, A. Long-term evolutionary stability of bacterial endosymbiosis in the Curculionidea: additional evidence of symbiont replacement in the Dryophthoridae family. *Molecular Biology and Evolution* 25, 859–868, 2008.
- Corrêa, A.S.; Pereira, E.J.G.; Cordeiro, E.M.G.; Braga, L.S.; Guedes, R.N.C. Insecticide resistance, mixture potentiation and fitness in populations of

- the maize weevil (*Sitophilus zeamais*). *Crop Protection* 30, 1655-1666, 2011.
- Danho, M.; Gaspar, C.; Haubruge, E. The impact of grain quality on the biology of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): oviposition, distribution of eggs, adult emergence, body weight and sex ratio. *Journal of Stored Products Research* 38, 259-266, 2002.
- de Oliveira, C.R.F.; Faroni, L.R.A.; Guedes, R.N.C.; Gonçalves, J.R.; Garcia, F.M. Biologia de *Acarophenax lacunatus* (Cross & Krantz) (Prostigmata: Acarophenacidae) sobre *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) (Coleoptera: Cucujidae). *Neotropical Entomology* 36, 459-464, 2007.
- Dickau, R.; Ranere, A.J.; Cooke, R.G. Starch grain evidence for the preceramic dispersals of maize and root crops into tropical dry and humid forests of Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 3651–3656, 2007
- Dong, K. A single amino acid change in the para sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (kdr) to pyrethroid insecticides in German cockroach. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27, 93–100, 1997.
- Evans, D.E. The biology of stored products Coleoptera. In: *Proc. Aust. Dev. Asst. Course on Preservation of Stored Cereals*. p.145-185, 1981.
- Faroni, L.R.D'A.; Guedes, R.N.C.; Matioli, A.L. Effect of temperature on development and population growth of *Acarophenax lacunatus* (Cross & Krantz) (Prostigmata: Acarophenacidae) on *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae). *Biocontrol Science and Technology* 11, 7-14, 2001.
- Floyd, E.H.; Newson, L.D. Biological study of the rice weevil complex. *Annals of the Entomological Society of America* 52, 687-695, 1959.
- Gudrups, I.; Floydb, S.; Klingc, J.G.; Bosque-Perezc, A. N.; Orcharda, J.E. A comparison of two methods of assessment of maize varietal resistance to

- the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, and the influence of kernel hardness and size on susceptibility. *Journal of Stored Products Research* 37, 287-302, 2001.
- Guedes, R.N.C. Manejo integrado para a proteção de grãos armazenados contra insetos. *Revista Brasileira de Armazenamento* 15, 39-48, 1991.
- Guedes, R.N.C.; Lima, J.O.G.; Cruz, C.D. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 31, 145-150, 1995.
- Guedes, N.M.P.; Guedes, R.N.C.; Campbell, J.F.; Throne, J.E. Contest behaviour of maize weevil larvae when competing within seeds. *Animal Behaviour*, 79, 281-289, 2010.
- Hagstrum, D. W.; Flinn, P.W. (Eds.) Integrated management of insects in stored products. New York: Marcel Dekker, p. 71-134, 1996.
- Halstead, D.G.H. External sex differences in stored-products Coleoptera. *Bulletin of Entomological Research* 54, 118–134, 1963.
- Heddi, A.; Lefebvre, F.; Nardon, P. Effect of endocytobiotic bacteria on mitochondrial enzymatic activities in the weevil *Sitophilus oryzae*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 23, 403– 411, 1993.
- Heddi, A.; Charles, H.; Khatchadourian, C.; Bonnot, G.; Nardon, P. Molecular characterization of the principal symbiotic bacteria of the weevil *Sitophilus oryzae*: A peculiar G-C content of an endocytobiotic DNA, *Journal of Molecular and Evolution* 47, 52–61, 1998.
- Heddi, A.; Grenier, A.M.; Khatchadourian, C.; Nardon, C.; Charles, H.; Nardon, P. Four intracellular genomes direct weevil biology: nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and *Wolbachia*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 6814–6819, 1999.
- Heddi, A.; Charles, H.; Khatchadourian, C. Intracellular bacterial symbiosis in the genus *Sitophilus*: the "Biological Individual" concept revisited. *Research in Microbiology* 152, 431-437, 2001.

- Hemingway, J.; Ranson, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology* 45, 371-391, 2000.
- Kaushal B.R.; Pant M.C.; Kalia S.; Joshi R.; Bora R. Aspects of the biology and control of the three species of acorn weevils infesting oak acorns in Kumaun Himalaya. *Journal of Applied Entomology*, 115, 388–397, 1993.
- Korunic, Z. Diatomaceous earths, a group of natural insecticides. *Journal of Stored Products Research* 34, 87-97, 1998.
- Kuschel, G. On problems of synonymy in the *Sitophilus oryzae* complex. *The Annals and magazine of natural history*, 13, 241–244, 1961.
- Lefèvre, C.; Charles, H.; Vallier, A.; Delobel, B.; Farrell, B.; Heddi, A. Endosymbiont phylogenesis in the Dryophthoridae weevils: evidence for bacterial replacement. *Molecular Biology and Evolution* 21, 965–973, 2004.
- Longstaff, B.C. Biology of the grain pest species of the genus *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae): a critical review. *Protection Ecology* 2: 83–130.
- Miyazaki, M.; Ohyama, K.; Dunlap, D.Y.; Matsumura, F. Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and kdr-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and housefly (*Musca domestica*). *Molecular and General Genetics* 252, 61–68, 1996.
- Nakakita, H. The inhibitory site of phosphine. *Journal of Pesticide Science* 1, 235–238, 1976.
- Nakakita, H. The mode of action of phosphine. *Journal of Pesticide Science* 12, 299–309, 1987.
- Narahashi, T. Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present and future. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 294, 1–26, 2000.

- Nardon, P.; Lefèvre, C.; Delobel, B.; Charles, H.; Heddi, A. Occurrence of endosymbiosis in Dryophthoridae weevils: Cytological insights into bacterial symbiotic structures. *Symbiosis* 33, 227–241, 2002.
- Obata, H.; Manabe, A.; Nakamura, N.; Onishi, T.; Senba, Y. A New Light on the Evolution and Propagation of Prehistoric Grain Pests: The World's Oldest Maize Weevils Found in Jomon Potteries, Japan. 6, e14785, 2011.
- O'Meara B. Bacterial Symbiosis and Plant Host Use Evolution in Dryophthorinae (Coleoptera, Curculionidae). A Phylogenetic Study Using Parsimony and Bayesian Analysis. Bachelor thesis, Department of Biology, Harvard University, 69 pp., 2001.
- Perez-Mendoza, J. Survey of insecticide resistance in Mexican populations of maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 35, 107-115, 1999.
- Pimentel, M.A.G.; Faroni, L.R.D.A.; Totola, M.R.; Guedes, R.N.C. Phosphine resistance, respiration rate and fitness consequences in stored-product research. *Pest Management Science* 63, 876–881, 2007.
- Pimentel, M.A.G.; Faroni, L.R.D'A.; Guedes, R.N.C.; Sousa, A.H.; Tótola, M.R. Phosphine resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 45, 71–74, 2009.
- Piperno, D.R.; Ranere, A.J.; Holst, I.; Iriarte, J.; Dickau, R. Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 5019-1024, 2009.
- Plarre, R. An attempt to reconstruct the natural and cultural history of the granary weevil, *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). *European Journal Entomology* 107, 1–11, 2010.
- Price, N.R. Some aspects of the inhibition of cytochrome c oxidase by phosphine in susceptible and resistant strains of *Rhyzopertha dominica*. *Insect Biochemistry* 10, 147–150, 1980.

- Rees, D.P. (1996) Coleoptera, pp. 1-40. Integrated Management of Insects in Stored Products (eds. Bh. Subramanyam & D.W. Hagstrum), pp. 1-40. Marcel Dekker, New York, NY.
- Ribeiro, B.M.; Guedes, R.N.C.; Oliveira, E.E.; Santos, J.P. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 39, 21-31, 2003.
- Santos, J.P.; Montovani, E.C. Avaliação de perdas quantitativas no milho armazenado a nível de fazenda. Sete Lagoas : CNPMS/EMBRAPA, 24p. 1997.
- Sousa, A.H.; Faroni, L.R.D'A.; Guedes, R.N.C.; Totola, M.R.; Urruchi, W.I. Ozone as a management alternative against phosphine-resistant insect pests of stored products. *Journal of Stored Products Research* 44, 379–385, 2008.
- Valmas, N.; Zuryn, S.; Ebert, P.R. Mitochondrial uncouplers act synergistically with the fumigant phosphine to disrupt mitochondrial membrane potential and cause cell death. *Toxicology* 252, 1–3, 33–39, 2008.
- Velten, G.; Rott, A.S.; Petit, B.J.C.; Cardona, C.; Dorn, S. Improved bruchid management through favorable host plant traits and natural enemies. *Biological Control* 47, 133–140, 2008.
- Wang, D.; Collins, P.J.; Gao, X. Optimising indoor phosphine fumigation of paddy rice bag-stacks under sheeting for control of resistant insects. *Journal of Stored Products Research* 42, 207–217, 2006.
- White, N.D.G.; Leesch, J.G. Chemical control. In: Subramayam BH, Hagstrum DW, eds. *Integrated Management of Insects in Stored Products*. New York: Marcel Dekker. p. 287-330, 1996.
- Wicker C. Differential vitamin and choline requirements of symbiotic and aposymbiotic *S. oryzae* (Coleoptera: Curculionidae), *Comp Biochemistry and Physiology* 76, 177–182, 1983.

- Williamson, M.S.; Martinez-Torres, D.; Hick, C.A.; Devonshire, A.L. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Molecular and General Genetics* 252, 51–60, 1996.
- Zuryn, S.; Kuang, J.; Ebert, P. Mitochondrial modulation of phosphine toxicity and resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicological Sciences* 102, 1, 179–186, 2008.

OBJETIVO GERAL

No presente estudo, propomos a utilização de uma abordagem filogeográfica para determinar a importância de fatores biogeográficos históricos e causas ecológicas contemporâneas em moldar a arquitetura genética e a distribuição das populações atuais do caruncho-do-milho (*Sitophilus zeamais*) existentes no Brasil. Desejamos assim elucidar qual a origem e amplitude da base genética das populações contemporâneas de *Sitophilus zeamais* do Brasil e, se possível, do planeta. Posteriormente, relacionar sobrevivência a fofina a possíveis marcadores mitocondriais. Para isto iremos analisar a relação filogeográfica e contrastar a variabilidade da sobrevivência a fofina de diferentes populações brasileiras do caruncho-do-milho. Os resultados obtidos irão proporcionar informações úteis sobre a distribuição espacial e temporal da diversidade genética atual de *Sitophilus zeamais* e sobre as relações evolutivas históricas das suas populações. Esta pesquisa irá trazer também conhecimentos básicos e práticos que poderão ser aplicados na elaboração de novas estratégias de manejo da praga e do melhoramento genético visando enfrentar, de forma racional, o ataque deste inseto-praga em armazéns brasileiros.

Capítulo 1: Distribuição das espécies relacionadas de carunchos, *Sitophilus oryzae* e *S. zeamais*, no Brasil.

Alberto S. Corrêa¹, Luiz Orlando de Oliveira², Lucas S. Braga¹, Raul Narciso C. Guedes¹

¹Departamento de Entomologia; Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.

²Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil

(in press: Insect Science [doi: 10.1111/j.1744-7917.2012.01559.x.]

RESUMO

O gênero *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae) abrange espécies-praga de grãos armazenados de grande importância econômica em todo o mundo. Entre estas espécies, o caruncho-do-arroz e o caruncho-do-milho (*Sitophilus oryzae* e *Sitophilus zeamais*, respectivamente) são particularmente importantes em climas tropicais. Estas duas espécies exibem grande similaridade morfológica e ecológica tornando difícil a identificação adequada e o reconhecimento da distribuição destas em regiões produtoras de grãos. Ambas as espécies são reportadas na América do Sul e particularmente no Brasil, mas suas respectivas distribuições e prevalências ainda não foram discutidas profundamente na região. Desta forma, vários insetos foram coletados por todo o Brasil e submetidos à identificação morfológica usando a genitália do macho e a identificação molecular com primers espécie-específicos desenhados exclusivamente para o reconhecimento das espécies. Os primers foram desenhados para amplificação específica de um fragmento do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI), os quais exibiram alta especificidade durante nossos ensaios preliminares com insetos de populações previamente identificadas. As estratégias de identificação foram realizadas com sucesso e indicaram predominância do caruncho-do-milho, *S. zeamais*, no país. Duas hipóteses podem explicar essa predominância: 1) a preferência do *S. zeamais* pelo milho como hospedeiro, este que é o principal cereal cultivado no Brasil, e 2) a melhor adaptação do *S. zeamais* em regiões tropicais, comparado com *S. oryzae*, que é mais disseminado em regiões subtropicais e temperadas.

Palavras-chave: caruncho-do-arroz, caruncho-do-milho, distribuição, Citocromo Oxidase Subunidade I, América do Sul.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae) é de grande interesse da comunidade científica, pois inclui espécies amplamente distribuídas e frequentemente registradas infestando produtos armazenados (Danho et al., 2002; Arthur & Throne, 2003; Plarre, 2010). Este gênero foi inicialmente descrito como *Curculio* Lineaus, 1758 e subsequentemente como *Calandra* Clairville e Schellenberg, 1798 e finalmente como *Sitophilus* Schoenherr, 1838, que finalmente, foi sancionado pela Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica em 1959 (Riley & Melville, 1959).

Quatorze espécies são descritas dentro do gênero *Sitophilus*, mas apenas três possuem importância econômica como praga – o caruncho-do-trigo *Sitophilus granarius* (L. 1758), o caruncho-do-arroz *Sitophilus oryzae* (L.1763) e o caruncho-do-milho *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Longstaff, 1981; Plarre, 2010). O caruncho-do-trigo é facilmente distinguível do caruncho-do-arroz e caruncho-do-milho, pela ausência de quatro manchas amarelo-avermelhadas no élitro e pela incapacidade de voar (Rees, 1996). *Sitophilus zeamais* e *S. oryzae* já foram consideradas duas raças de uma mesma espécie (Richards, 1944; Kiritani, 1956), apresentam características morfológicas e ecológicas muito similares, e são frequentemente identificadas de maneira errada, proporcionando dúvidas sobre a distribuição e ocorrência destas duas espécies em uma escala global (Hidayat et al., 1996; Peng et al., 2003). Estes constantes erros de identificação estão também associados a crenças errôneas de especificidade de hospedeiros e do maior tamanho e peso dos indivíduos de *S. zeamais* em relação aos de *S. oryzae*. Até o presente momento a identificação mais utilizada para as duas espécies são mínimas diferenças morfológicas na genitália masculina e feminina (Floyd & Newson, 1959; Kuschel, 1961; Halstead, 1963).

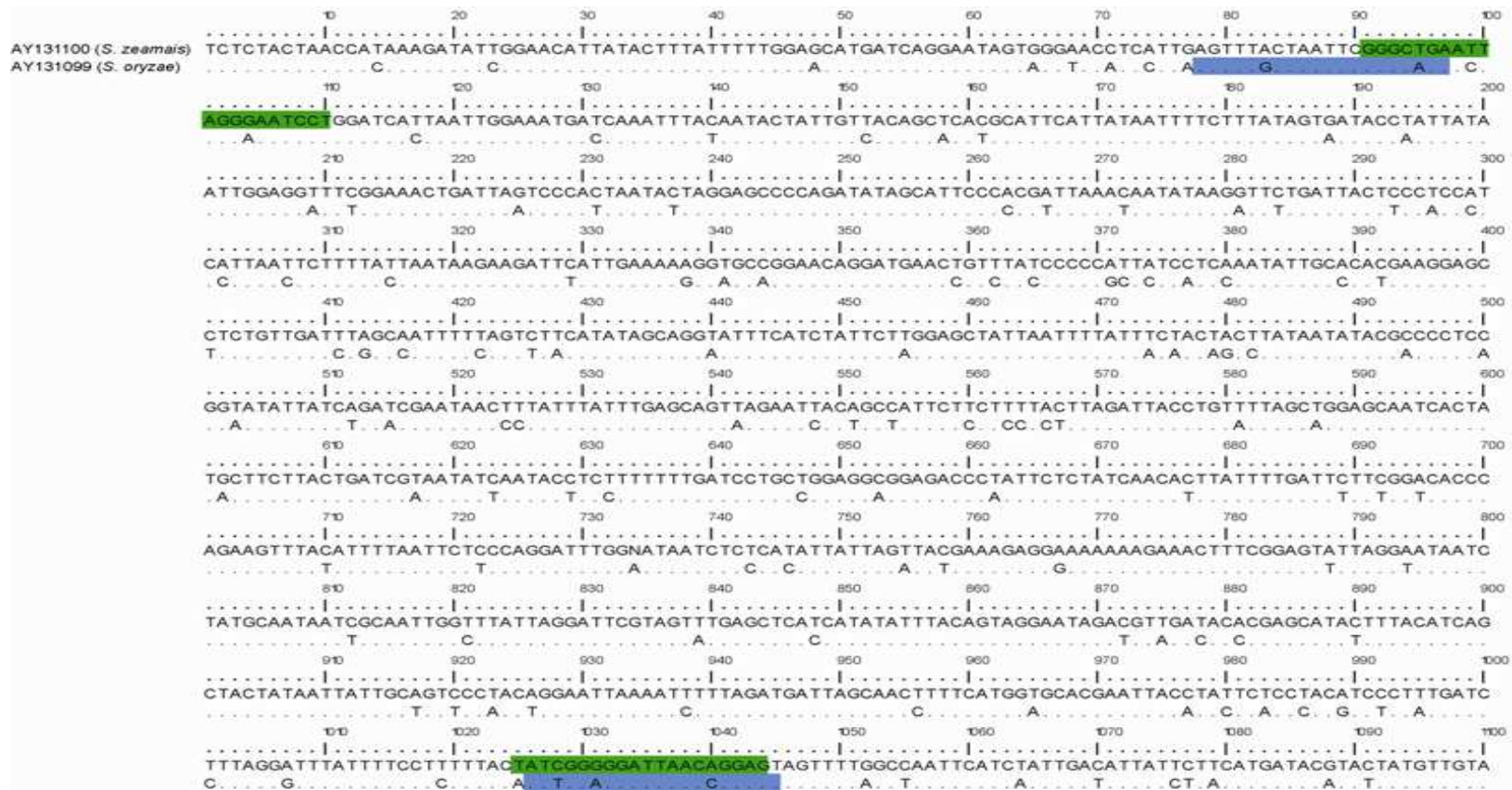
Advindo do crescimento e da popularização das ferramentas moleculares, técnicas moleculares têm sido constantemente utilizadas para a identificação de espécies de difícil diferenciação morfológica, como os caruncho-do-milho e caruncho-do-arroz. Hidayat et al. (1996) utilizou com

sucesso marcadores moleculares RAPD e RFLP para distinguir indivíduos provenientes de colônias de laboratório das duas espécies. No entanto, o uso desses marcadores é associado ao alto custo e onerosidade das técnicas (Schlorrerer, 2004). Um esforço mais recente de Peng et al. (2003) levou ao desenho de primers na região do Espaço Interno Transcrito (ITS-2) para amplificar fragmentos do DNA nuclear ribossomal (nrDNA) sendo também capaz de distinguir colônias de laboratório de caruncho-do-arroz e caruncho-do-milho. No entanto, estes primers não foram posteriormente testados em outras populações destas espécies para validação adicional.

Desta forma, nosso objetivo foi mapear a distribuição dessas duas espécies de caruncho no território brasileiro e, com isso, expandir o diagnóstico inicial da distribuição dessas espécies feita apenas no estado brasileiro de São Paulo no final da década de 1960 (Rosseto, 1969). Essa distribuição foi determinada usando duas técnicas: inspeção da genitália dos machos e amplificação de uma região do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI) usando primers espécie-específicos com a intenção de distinguir os caruncho-do-milho e do caruncho-do-arroz. O uso de ambas as técnicas foi empenhado para permitir confirmação adicional da identificação das espécies e validar a ferramenta molecular, que pode ser útil quando a identificação pela genitália não for possível devido a exemplares danificados ou limitados ou pela falta de pessoal treinado para a identificação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Sequências de nucleotídeos contendo fragmento do gene citocromo oxidase I (COI) de ambas as espécies de carunchos (*S. zeamais* e *S. oryzae*) foram obtidas de um sistema público de depósito de sequências de material genômico (GenBank número de acesso AY131100 e AY131099, respectivamente) e usados para desenhar os primers espécie-específicos (Fig. 1).



1
2 Figura 1. Alinhamento de fragmentos das sequencias de COI de *S. zeamais* e *S. oryzae* obtidas no GenBank (numero de dos
3 acessos AY131100 e AY131099, respectivamente). Os pontos significam similaridades entre os nucleotídeos. As regiões
4 sobreadas indicam a posição de anelamento dos primers espécie-específicos para ambas as espécies.

Posteriormente realizamos a extração do DNA total, seguindo a metodologia de Clark et al. (2001), de 58 indivíduos de seis populações de carunchos (três de *S. zeamais* e três de *S. oryzae*), previamente identificadas e provenientes de regiões geográficas distintas. As populações de caruncho-do-milho são provenientes do Brasil (Sete Lagoas), Peru (Lima) e Moçambique (Maputo), enquanto as populações de caruncho-do-arroz provieram do Peru (Lima), Canadá (Winnipeg) e Moçambique (Chokwe).

A amplificação via PCR foi realizada em volume total de 25 µL, contendo 3 µL de DNA total (40ng), 12,1 µL de ddH₂O, 5 µL de tampão IVB (5x; Phoneutria, Belo Horizonte, 107 MG, Brasil), 0,7 µL de dNTP (2,5 mM), 2 µL de cada primer (5 mM) (forward (F) e reverse (R)) e 0,5 U de Taq polimerase (Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brasil). Os ciclos de PCR para os dois conjuntos de primers foram iniciados com uma desnaturação de 5 min a 94 °C seguidos por 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C por 45 s e 72 °C por 1,5 min e uma extensão final a 72 °C por 10 min. Posteriormente 5 µl do produto da PCR foi aplicado em gel de agarose (1,5 %) e visualizado sob luz ultravioleta e suas imagens digitalizadas em um sistema de captura de imagens (Eagle Eye, Stratagene, La Jolla, CA, USA).

A avaliação de 37 populações coletadas a campo por todo o território brasileiro resultou na análise de 518 indivíduos (14 indivíduos de cada população). Os sítios de amostragem foram escolhidos para cobrir a maior parte da região de produção e armazenagem de grãos de milho no país (Fig. 2 e Tabela 1). A identificação morfológica das espécies baseada na genitália seguiu a metodologia de Halstead (1963) utilizando sete indivíduos machos por população. Machos de caruncho-do-arroz exibem o adeago com superfície suavemente convexa, enquanto machos de caruncho-do-milho exibem adeago com dois sulcos longitudinais. Outros sete indivíduos foram usados para identificação molecular usando primers mitocondriais espécie-específicos. Para o caruncho-do-milho, foram desenhados e utilizados os primers 5'-GGGCTGAATTAGGGAATCCT-3' (forward primer) e 5'- CTCCTGTTAATCCCCCGATA-3' (reverse primer) e para o caruncho-do-arroz os primers 5'- AGTTTGCTAATTCGGGCAGA - 3' (forward primer) e 5'-

ACTCCGGTTAATCCTCCAAT-3' (reverse primer). Depois da identificação molecular, os fragmentos amplificados de pelo menos três indivíduos de cada população previamente identificada foram sequenciados para confirmar a identidade das sequências e validar a metodologia de identificação molecular aqui apresentada.

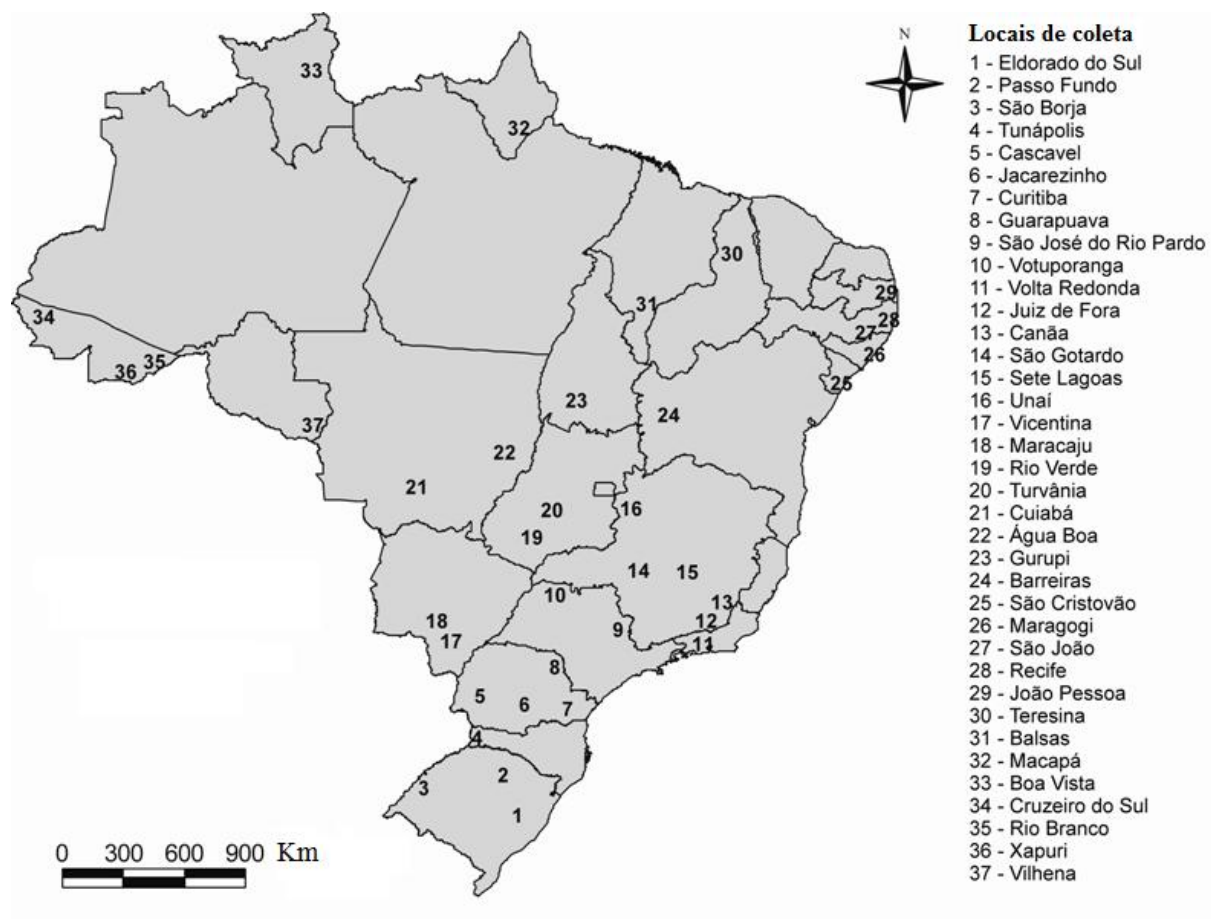


Figura 2. Locais de coleta de 37 populações de *Sitophilus sp.* no Brasil

Tabela 1. Populações brasileiras de caruncho-do-milho (*Sitophilus* sp.) indicadas na Fig. 2 com suas respectivas cidade de origem, estado, hospedeiro de coleta e coletor.

Nº.	Estado	Cidade	Hospedeiro de coleta	Coletor
1	Rio Grande do Sul	Eldorado do Sul	Milho	R. Dionello
2	Rio Grande do Sul	Passo Fundo	Milho	M. Savaris
3	Rio Grande do Sul	São Borja	Arroz	S. Lazzari
4	Santa Catarina	Tunápolis	Milho	M.A. Pimentel
5	Paraná	Jacarezinho	Milho	J. Santos
6	Paraná	Guarapuava	Milho	M.A. Pimentel
7	Paraná	Cascavel	Milho/Arroz*	F. Lazzari
8	Paraná	Curitiba	Arroz	S. Lazzari
9	São Paulo	S. J. do Rio Pardo	Milho	M.A. Pimentel
10	São Paulo	Votuporanga	Milho	M.A. Pimentel
11	Rio de Janeiro	Volta Redonda	Milho/Arroz	A. Corrêa
12	Minas Gerais	Juiz de Fora	Milho	A. Santos
13	Minas Gerais	Canaã	Milho/Arroz	A. Corrêa
14	Minas Gerais	São Gotardo	Milho/Trigo	R. Guedes
15	Minas Gerais	Sete Lagoas	Milho	J. Santos
16	Minas Gerais	Unaí	Arroz	M.A. Pimentel
17	Mato Grosso do Sul	Vicentina	Milho	L. Silva
18	Mato Grosso do Sul	Maracaju	Milho	L. Silva
19	Goiás	Rio Verde	Milho	M.A. Pimentel
20	Goiás	Turvânia	Milho	M.A. Pimentel
21	Mato Grosso	Cuiabá	Milho/Arroz	M.A. Caneppele
22	Mato Grosso	Água Boa	Milho	M.A. Pimentel
23	Tocantins	Gurupi	Milho	J. Rosado
24	Bahia	Barreiras	Milho	L. Silva
25	Sergipe	São Cristovão	Milho/Sorgo	L. Bacci
26	Alagoas	Maragogi	Milho	A. Corrêa
27	Pernambuco	São João	Milho	C. Badji
28	Pernambuco	Recife	Milho	A. Corrêa
29	Paraíba	João Pessoa	Milho	A. Corrêa
30	Piauí	Teresina	Milho	L. Silva
31	Maranhão	Balsas	Milho	L. Silva
32	Amapá	Macapá	Milho	R.A. Silva
33	Roraima	Boa Vista	Milho	E. Moraes
34	Acre	Cruzeiro do Sul	Milho	M. Fazolin
35	Acre	Rio Branco	Milho	M. Fazolin
36	Acre	Xapuri	Milho	M. Fazolin
37	Rondônia	Vilhena	Milho	R. Reis

* (/) populações resultantes de coletas no mesmo local, mas em dois hospedeiros distintos.

3. RESULTADOS

A amplificação via PCR do fragmento de COI de *S. zeamais* e *S. oryzae* foi de alta especificidade, não ocorrendo nenhuma amplificação inespecífica para os 58 indivíduos testados das populações previamente identificadas. Para ambas as espécies de caruncho, a amplificação resultou em uma única banda com tamanho aproximado de 950 pb (Fig. 3).

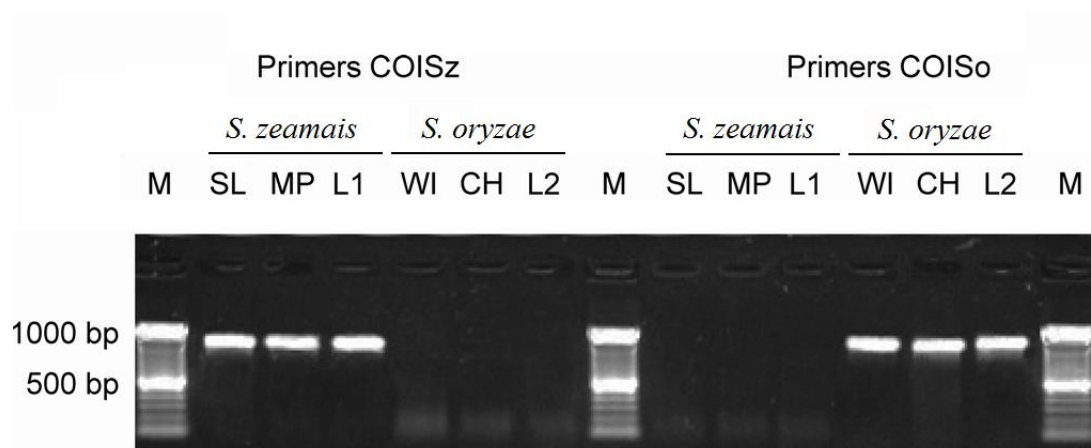


Fig. 3. Amplificação dos fragmentos do COI de dois indivíduos de cada uma das seis populações previamente identificadas utilizando primers espécie-específicos para *S. zeamais* e *S. oryzae*. M – Marcador Molecular; SL – Sete Lagoas; MP – Maputo; L1 – Lima; WI – Winnipeg; CH – Chokwe; L2 – Lima.

Posteriormente, nós validamos a estratégia molecular desenvolvida utilizando primers espécie-específicos e somada a identificação da genitália dos machos, nós obtemos a distribuição do caruncho-do-milho e do caruncho-do-arroz no território brasileiro. Um total de 518 indivíduos, de 37 populações, foram submetidos à identificação molecular e morfológica, que forneceram resultados coincidentes. Entre as 37 populações de caruncho avaliadas, apenas três foram identificadas como de caruncho-do-arroz (Cascavel, Curitiba e São Borja).

4. DISCUSSÃO

O gene COI é reconhecidamente variável dentro dos genomas de insetos e seu uso tem sido sugerido para identificação molecular das espécies (Hebert et al., 2003). Este gene foi utilizado com sucesso em

espécies das ordens Diptera (Smith et al., 2007; Blacket et al., 2012), Hemiptera (Sufran & Puterka, 2011), Hymenoptera (Stewart et al., 2010), e Lepidoptera (Emery et al., 2011; Hrcek et al., 2011). O gene COI também já foi utilizado com sucesso para identificação de outras espécies “irmãs” cuja identificação baseada unicamente em aspectos morfológicos é de difícil execução (Herbert et al., 2004; Ellis et al., 2006; Smith et al., 2006; Koch, 2010). O fato do caruncho-do-arroz e o caruncho-do-milho serem consideradas espécies “irmãs” sugere sua extrema semelhança morfológica e ecológica (Birch, 1944; Hidayat et al., 1996; Peng et al., 2003; Plarre, 2010) e aqui nós fomos capazes de desenhar primers espécie-específicos para sua identificação.

Os primers espécie-específicos foram desenhados e testados usando três populações de cada espécie de caruncho provenientes de diferentes países e os resultados obtidos da avaliação dos 48 indivíduos foram confirmados com a identificação das espécies utilizando a genitália masculina e por sequenciamento do gene. Eles foram subsequentemente utilizados para identificação de 37 populações brasileiras e dessas apenas três foram verificadas como caruncho-do-arroz. Essas três populações de caruncho-do-arroz estão localizadas no sul do Brasil, no entanto nesta região também ocorreram populações de caruncho-do-milho. Este resultado indica alta prevalência do caruncho-do-milho sobre o caruncho-do-arroz no Brasil, como observado anteriormente no estado de São Paulo na década de 1960 (Rossetto, 1969).

A distribuição de ambas as espécies reportadas aqui fornecem suporte para a hipótese de que o caruncho-do-milho prevalece em condições tropicais e que o caruncho-do-trigo e o caruncho-do-arroz são melhores adaptados a condições subtropicais e temperadas (Longstaff, 1981). No Brasil, climas de condições subtropicais com temperatura média em torno de 20°C ocorrem principalmente no sul do país, de onde as três populações de caruncho-do-arroz foram obtidas. No entanto, o caruncho-do-milho também ocorreu naquela região, mas aparentemente em coocorrência com o caruncho-do-arroz. O caruncho-do-trigo, *S. granarius*, não é uma

praga de cereais comum no Brasil, provavelmente porque é mais adaptado a condições de clima temperado que não ocorrem no país.

Uma explicação alternativa para a ampla distribuição do caruncho-do-milho no Brasil é a adaptação ao hospedeiro (Floyd & Newson, 1959; Hill, 1990; Rees, 1996). Em nossa avaliação, as populações de caruncho-do-arroz foram obtidas do arroz (que em alguns casos é armazenado próximo ao milho), enquanto as populações de caruncho-do-milho foram coletadas em milho ou na mistura arroz/milho. Este fato sugere que o caruncho-do-arroz e o caruncho-do-milho apresentam preferência por hospedeiros distintos e também explicaria a prevalência do caruncho-do-milho no Brasil, onde campos de cultivo de milho são mais frequentes e amplamente distribuídos. O caruncho-do-arroz é mais frequentemente reportado em cereais de grãos pequenos (i.e. trigo, arroz e sorgo), ao contrário do caruncho-do-milho (Haines, 1981). No entanto, a ocorrência do caruncho-do-milho é frequente em grãos de sorgo no Brasil (Rossetto, 1969), e como o caruncho-do-milho também prevaleceu em áreas produtoras de arroz e milho na região central do Brasil, condições mais quentes de clima são provavelmente mais importantes para determinar a prevalência do caruncho-do-milho no país.

O caruncho-do-arroz e caruncho-do-milho parece raramente coocorrerem na mesma fonte de alimento até quando eles estão localizados em locais próximos, como mostrado neste trabalho e em estudos anteriores (Rossetto, 1969; Throne & Cline, 1991; Hidayat et al., 1996). Além disso, uma espécie parece quase sempre eliminar a outra e sua prevalência pode variar dependendo das condições ambientais (Longstaff, 1981; Hidayat et al., 1996). A temperatura parece particularmente importante como determinante para a competição entre as espécies, com o caruncho-do-milho prevalecendo em condições mais quentes (Longstaff, 1981; Rees, 1996). Tal efeito da temperatura pode também desempenhar um papel na prevalência sazonal de cada espécie (Throne & Cline, 1989, 1991). Na maior parte do Brasil, a variação sazonal da temperatura é relativamente pequena o que aparentemente favorece o caruncho-do-milho, exceto no sul,

onde a temperatura é significativamente baixa durante o inverno. Esta pode ser a principal razão para encontrarmos caruncho-do-arroz em amostras dessa região. Adicionalmente, o caruncho-do-milho é reconhecido como um grande dispersador pelo vôo e frequentemente se move dos armazéns para lavouras de cereais em amadurecimento e se estabelecem antes de colheita (Throne & Cline, 1989; Rees, 1996; Guedes et al., 2009), o que também parece favorecer sua dispersão e ampla ocorrência no Brasil.

Em conclusão, nós desenhamos de maneira eficiente primers espécie-específicos para identificação das espécies irmãs *S. zeamais* e *S. oryzae* através da PCR e visualização em gel de agarose. Este procedimento refletiu a identificação morfológica das espécies, no entanto, possui vantagem de não possuir uma margem de erro de 10% geralmente associada com a identificação baseada unicamente na morfologia (quando realizada por pessoal treinado). Também determinamos a distribuição de cada espécie pelo território brasileiro, relacionando a prevalência do caruncho-do-milho no Brasil e ocorrência do caruncho-do-arroz apenas no sul do país. O reconhecimento da predominância de ocorrência do *S. zeamais* dentro do território brasileiro ajudará na orientação correta e na gestão de procedimentos contra essas espécies-praga, que frequentemente exibe resistência a inseticidas piretróides no país (ver Guedes et al., 1995; Ribeiro et al., 2003; Corrêa et al., 2011).

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos a Paul Fields, Hipólito Malia, Javier Vasquez-Castro e Jamilton Santos por doarem as populações para o desenvolvimento inicial dos primers. A todos os colegas listados na Tabela 1 pelo empenho em coletar e enviar as populações de insetos utilizadas para mapear a distribuição dos carunchos no Brasil. E as instituições FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela

concessão de bolsas e financiamento de projetos que permitiram a realização do trabalho.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arthur, F.H.; Throne, J.E. Efficacy of diatomaceous earth to control internal infestations of rice weevil and maize weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology* 96, 510–518, 2003.
- Birch, L.C. Two strains of *Calandra oryzae* L. (Coleoptera). *Australian Journal of Zoology* 2, 66-74, 1944.
- Blackett, M.J.; Semeraro, L.; Malipatil, M.B. Barcoding Queensland Fruit Flies (*Bactrocera tryoni*): impediments and improvements. *Molecular Ecology Resources*, 12, 428–436, 2012.
- 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* 10, 303-314, 2001.
- Corrêa, A.S.; Pereira, E.J.G.; Cordeiro, E.M.G.; Braga, L.S.; Guedes, R.N.C. Insecticide resistance, mixture potentiation and fitness in populations of the maize weevil (*Sitophilus zeamais*). *Crop Protection* 30, 1655-1666, 2011.
- Danho, M.; Gaspar, C.; Haubruge, E. The impact of grain quality on the biology of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): oviposition, distribution of eggs, adult emergence, body weight and sex ratio. *Journal of Stored Products Research* 38, 259-266, 2002.
- Ellis, J.S.; Knight, M.E.; Carvell, C.; Goulson, D. Cryptic species identification: a simple diagnostic tool for discriminating between two problematic bumblebee species. *Molecular Ecology Notes* 6, 540-542, 2006.
- Emery, V.J.; Landry, J.F.; Eckert, C.G. Combining DNA barcoding and morphological analysis to identify specialist floral parasites (Lepidoptera:

- Coleophoridae: Momphinae: Mompha). *Molecular Ecology Resources* 9, 217–222, 2009.
- Floyd, E.H.; Newson, D.L. Biological study of the rice weevil complex. *Annals of the Entomological Society of America* 52, 687-695, 1959.
- Guedes, N.M.P.; Guedes, R.N.C.; Ferreira, G.H.; Silva, L.B. Flight take-off and walking behavior of insecticide-susceptible and -resistant populations of *Sitophilus zeamais*. *Bulletin of Entomological Research* 99, 393–400, 2009.
- Guedes, R.N.C.; Lima, J.O.G.; Santos, J.P.; Cruz, C.D. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 31, 145-150, 1995.
- Halstead, D.G.H. External sex differences in stored-products Coleoptera. *Bulletin of Entomological Research* 54, 118–134, 1963.
- Haines, C.P. *Insects and Arachnids from Stored Products: A Report on Specimens Received by the Tropical Stored Products Centre 1973-1977*. TDRI, London. (TDRI Publ. No. L54). 1981.
- Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L.; DeWaard, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B* 270, 313-321, 2003.
- Hebert, P.D.N.; Penton, E.H.; Burns, J.M.; Janzen, D.H.; Hallwachs, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 41, 14812-14817, 2004.
- Hidayat, P.; Phillips, T.W.; French-Constant, R.H. Molecular and morphological characters discriminate *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and confirm reproductive isolation. *Annals of the Entomological Society of America* 89, 645–652, 1996.
- Hill, D.S. *Pest of Stored Products and their Control*. CRC, Boca Raton, FL. 1990.

- Hrcek, J.; Miller, S.E.; Quicke, D.L.J.; Smith, M.A. Molecular detection of trophic links in a complex insect host–parasitoid food web. *Molecular Ecology Resources* 11, 786–794, 2011.
- Kiritani, K. On the local distribution of two allied species of the rice weevils *Calandra oryzae* and *C. sasaki*. *Japanese Journal of Applied Zoology* 21, 74-77, 1956.
- Koch, H. Combining morphology and DNA barcoding resolves the taxonomy of Western Malagasy *Liotrigona* Moure, 1961 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *African Invertebrates* 51, 413-421, 2010.
- Kuschel, G. On problems of synonymy in the *Sitophilus oryzae* complex. *Annals and Magazine of Natural History Series* 13: 241–244, 1961.
- Longstaff, B.C. Biology of the grain pest species of the genus *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae): a critical review. *Protection Ecology* 2, 83–130, 1981.
- Peng, W.K.; Lin, H.C.; Chen, C.N.; Wang, C.H. DNA identification of two laboratory colonies of the weevils, *Sitophilus oryzae* (L.) and *S. zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) in Taiwan. *Journal of Stored Products Research* 39, 225-235, 2003.
- Plarre, R. An attempt to reconstruct the natural and cultural history of the granary weevil, *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). *European Journal of Entomology* 107, 1–11, 2010.
- Rees, D.P. Coleoptera, pp. 1-40. *Integrated Management of Insects in Stored Products* (eds. Bh. Subramanyam & D.W. Hagstrum), pp. 1-40. Marcel Dekker, New York, NY. 1996.
- Ribeiro, B.M.; Guedes, R.N.C.; Oliveira, E.E.; Santos, J.P. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 39 21-31, 2003.

- Richards, O.W. The two strains of the rice weevil *Calandra oryzae* (L.) (Coleoptera Curculionidae). Transactions of the Entomological Society of London 94, 187-200, 1944.
- Riley, N.D.; Melville, R.V. Suppression under the plenary powers of the generic name *Calandra* Clairville and Schellenberg, 1798, and validation under the same powers of the specific name *abbreviatus* Fabricius, 1787, as published in the binomen *Curculio abbreviatus* (class Insecta, order Coleoptera). Bulletin of Zoological Nomenclature 17, 112-116, 1959.
- Rossetto, C.J. O Complexo de *Sitophilus spp* (Coleoptera Curculionidae) no estado de São Paulo. Bragantia 28, 127-148, 1969.
- Santos, A.M.C.; Besnard, G.; Quicke, D.L.J. Applying DNA barcoding for the study of geographical variation in host–parasitoid interactions. Molecular Ecology Resources 11, 46–59, 2010.
- Schlötterer, C. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? Nature Reviews Genetics 5, 63-69, 2004.
- Shufran, K.A.; Puterka, G.J. DNA barcoding to identify all life stages of holocyclic cereal aphids (Hemiptera: Aphididae) on wheat and other Poaceae. Annals of the Entomological Society of America 104, 39-42, 2011.
- Smith, M.A.; Woodley, N.E.; Janzen, D.H.; Hallwachs, W.; Hebert, P.D.N. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). Proceedings of the National Academic of Sciences USA 103, 3657-3662, 2006.
- Smith, M.A.; Woodley, N.E.; Janzen, D.H.; Hallwachs, W., Hebert, P.D.N. DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. Proceedings of the National Academic of Sciences USA 104, 4967-4972, 2007.

Stewart, L.C.; Hale, R.J.; Hale, M.L. Species-specific primers for the molecular identification of cryptic *Bombus* species in New Zealand. *Conservation Genetics* 11, 1207–1209, 2010.

Throne, J.E.; Cline, L.D. Seasonal flight activity of the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), and the rice weevil, *S. oryzae* (L.), in South Carolina. *Journal of Agricultural Entomology* 6, 183–192, 1989.

Throne, J.E.; Cline, L.D. Seasonal abundance of maize and rice weevils (Coleoptera: Curculionidae) in South Carolina. *Journal of Agricultural Entomology* 8, 93–100, 1991.

Capítulo 2: Caracterização e transferabilidade de marcadores de microssatélites para as espécies-praga do gênero *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae).

Alberto S. Corrêa¹, Christina Cleo Vinson², Raul Narciso C. Guedes¹, Luiz Orlando de Oliveira²

¹Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, Brazil

²Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, Brazil

(*aceito*: Molecular Ecology Resources)

RESUMO

Os carunchos do gênero *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae) são importantes pragas dos cereais armazenados no mundo e seu manejo sustentável em unidades armazenadoras tem apresentado sérias falhas. Aqui nós trazemos o primeiro registro de marcadores de microssatélites para as três pragas do gênero *Sitophilus*, *Sitophilus granarius*, *S. oryzae* e *S. zeamais*. Foram isolados e caracterizados 10 marcadores de microssatélites para *S. zeamais* (caruncho-do-milho). Os marcadores foram testados em três diferentes populações (Viçosa-Brazil, Mapula-Mozambique e Richvale-USA) e geraram um número médio de alelos por locus de 4,11, 3,44 e 3,55, e heterozigodade média esperada de 0,45, 0,49 e 0,43; respectivamente. Seis destes marcadores foram transferidas com sucesso para *S. granarius* e quatro para *S. oryzae*.

Palavras-chave: *Sitophilus zeamais*, *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus granarius*, pragas de grãos armazenados, marcador molecular.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae) compreende 14 espécies, sendo três consideradas pragas de importância econômica para produtos armazenados, *Sitophilus granarius* (L., 1758), *Sitophilus oryzae* (L., 1763) e *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Hidayat *et al.* 1996; Rees 1996; Plarre, 2010). Estes carunchos são pragas cosmopolitas, com capacidade de atacar os grãos no campo e, principalmente, no armazém, onde causam maiores danos podendo inviabilizar o comércio e consumo do produto infestado (Rees, 1996).

Estudos relacionados a estratégias de controle (Athanassiou & Steenberg, 2007; Souza *et al.*, 2008; Phillips & Throne, 2010) e resistência a pesticidas (Guedes *et al.*, 1995; Ribeiro *et al.*, 2003; Corrêa *et al.*, 2011) são constantemente reportados para as três pragas do gênero *Sitophilus*, assim como a interação destas com endossimbiontes celulares (Heddi *et al.*, 1999; 2001; Rio *et al.*, 2003). No entanto, informações sobre a estrutura genética, distribuição espacial e temporal, bem como a influência dos fatores ecológicos e antrópicos na dinâmica populacional destas pragas, importantes para a sustentabilidade de programas de manejo, são extremamente restritas e pobres. Marcadores moleculares e bioquímicos são ferramentas extremamente úteis para a realização de estudos populacionais em condições naturais (Schlötterer, 2004) e a baixa acurácia e inexistência dos mesmos é um dos principais entraves para a realização destas pesquisas em populações naturais de carunchos. Desta forma, neste trabalho, visamos desenvolver primers para amplificação dos primeiros *loci* de microssatélites para as espécies-praga do gênero *Sitophilus*. Inicialmente, desenvolvemos e caracterizamos com sucesso 10 marcadores de microssatélites para *S. zeamais* (caruncho-do-milho) e posteriormente, realizamos ensaios de transferibilidade destes para *S. oryzae* (caruncho-do-arroz) e *S. granarius* (caruncho-do-trigo).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Indivíduos de *S. zeamais* coletados em armazéns de grãos no município de Viçosa, MG, Brasil (20° 45' 14" S; 42° 52' 55" W) foram utilizados para a construção da biblioteca genômica enriquecida de acordo com o protocolo descrito por Billotte et al., (1999). Das 285 colônias recombinantes selecionadas, 48 foram sequenciadas. Após o sequenciamento, os fragmentos foram editados manualmente com auxílio do programa Sequencher 4.1.4 (Gene Codes Corp. Ann Harbor, MI, USA). Posteriormente para identificação das regiões simples repetidas foi utilizado o aplicativo WebSat (Martins et al., 2009). Já os primers foram desenhados com o auxílio dos aplicativos WebSat e Primer Premier software (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) para as seguintes condições: produto de PCR com tamanho de 100 a 350 pb, temperatura média de anelamento 55°C e comprimento do primer entre 18 a 22 pb.

A reação de PCR para todos os primers foi realizada em um total de 13 uL, contendo 50ng de DNA total, tampão 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 1% Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂), MgCl₂ (2,5 mM), dNTP (50 uM de cada), 0,3 mM de cada primer (R e F) e 0,75 U de Taq (Phoneutria, Biotecnologia, Belo Horizonte, MG, Brasil). As condições amplificação para todos os 10 conjuntos de primers foram de 4 min a 94 °C de desnaturação inicial, seguidos por 35 ciclos de 94 °C por 30s, 55 °C por 45s e 72 °C por 1 min e uma extensão final a 72 °C por 20 min usando termociclador modelo Vapo Protect (Eppendorf, Hamburg, Germany). Os primers forward dos 10 loci foram marcados com marcadores fluorescentes 6-FAM, HEX e NED (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As amplificações foram realizadas quatro reações de multiplex, sendo duas delas contendo três conjuntos de primers (3H6-1D10-3G7, 1A1-1B1-1G7) e duas contendo dois conjuntos de primers (3A11-3G1, 1E1-1B10). Para as reações de multiplex foram também realizadas em um total de 13 uL, contendo 50ng de DNA total, tampão 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 1% Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂), MgCl₂ (2,5 mM), dNTP (50 uM de cada), 0,3 mM de cada primer (R e F) e 1,0 U de Taq (Phoneutria, Biotecnologia, Belo Horizonte, MG, Brasil).

Vinte quatro indivíduos de cada população de *S. zeamais* coletados em armazéns de grãos situados nas cidades de Viçosa, MG, Brasil; Mapula, Cabo Delgado, Moçambique (11° 55' 14" S; 39° 48' 49" E); e Richvale, California, EUA (39° 28' 38" N; 121° 44' 41" W) foram utilizados nos testes de polimorfismo. Já para os testes de transferibilidade foram utilizadas uma população de *S. oryzae* coletada em plantios de milho proveniente da cidade de Eldorado do Sul, RS, Brasil (30° 05' 52" S; 51° 39' 08" W) e uma população de *S. granarius* de laboratório proveniente de Campobasso, Molise, Itália (41° 34' 08" N; 14° 40' 00"E). A avaliação de polimorfismo foi realizada em sequenciador ABI PRISM 3130xl DNA Analyser (Applied Biosystems) usando Applied Biosystems' GeneScan 500 Rox size standard. Os fragmentos foram marcados e editados usando o programa GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems). O número de alelos por locus, a heterozigosidade média observada e esperada foram calculados utilizando o programa GDA versão 1.1 (Genetic Data Analysis) (Lewis & Zaykin 2001). Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação foram estimados pelo programa FSTAT (Goudet, 2002) e a frequência de alelos nulos utilizando o aplicativo MICRO-CHECKER version 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 10 loci testados anteriormente apenas um mostrou-se monomórfico, 1B10 (acesso no GenBank: JX303743), primer F: 5' GGTCCGATCTCATTGGAGTAG 3' e primer R: 5' AGGCAAGAATGGAAGCTATCG 3'. Nos loci polimórficos houve uma variação de 3 a 7 alelos por locus com valores médios de 4,11 para Viçosa, 3,44 para Mapula e 3,55 para Richvale (Tabela 1). A heterozigosidade média observada/esperada foi de 0,45/0,62, 0,49/0,48 e 0,43/0,52 para Viçosa, Mapula e Richvale, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Sequencia dos primers, condições da PCR e estatísticas de polimorfismo para nove microssatélites *loci* de três populações de *Sitophilus zeamais*.

Locus	Nº de acesso do GenBank	Sequência dos primers (5'- 3')	Motivo repetidos (bp)	Tamanho do fragmento (bp)	Viçosa		Mapula		California	
					N _a	Ho/He	N _a	Ho/He	N _a	Ho/He
1E1	JX303735	F: CACCGATATACCTGCCAAAATA R: AAAACGACAGATAGAACCTCGG	(GT) ₇	277-281	3	0.50/0.66	2	0.70/0.49	3	0.21/0.32
1A1	JX303736	F: CACCCTGTATATCGAGAGAACAT R: TACAAAATTATCATCGCCCCTC	(TG) ₆	235-253	5	0.72/0.63	4	0.21/0.66	5	0.59/0.72
1B1	JX303736	F: TAATGCGACTTGTTTGAGGATG R: ACAACGATTTCTTTATCACCCG	(GT) ₇	149-161	5	0.53/0.52	4	0.77/0.75	3	0.29/0.43
1D10	JX303738	F: ACATTCAGGAGTGGTCTTGGTC R: CTCGGGATTAGCCAACAATAGA	(ATC) ₆	249-261	3	0.90/0.63	2	0.96/0.50	5	0.48/0.54
1G7	JX303739	F: TTCAAGAAATATCCAGCTACCC R: TCTATTGTTGTCTATTGAGCACTT	(GT) ₈	105-109	2	0.18/0.49	1	0.00/0.00	3	0.87/0.64
3A11	JX303740	F: ATATTAGAGCGGGGCTGGTT R: CTCCCCTTTGGTGTGATGTAGT	(TG) ₈	241-313	6	0.24/0.79	7	0.52/0.69	3	0.23/0.28
3H6	JX303741	F: CAAGGAAGTCTGGATAAATGGT R: GTGACCCTCGTGTCTTGGTAGT	(TG) ₆	284-318	6	0.24/0.73	4	0.23/0.44	3	0.10/0.62
3G1	JX303742	F: CCTGGTTTTGTTTGATATGGAG R: TTCTGGTGTGGATGTGAATGTA	(CA) ₇	140-152	4	0.60/0.56	5	0.96/0.63	5	0.91/0.65
3G7	JX303743	F: GTTTCGTGATCCGGTTTTGT R: GCGCTAGCCTGAGGAGAAT	(AG) ₉ (GA) ₆	187-193	3	0.13/0.57	2	0.95/0.18	2	0.18/0.52

Os motivos repetidos são listados 5' to 3' com os respectivos forward primer (F). N_a: Número de alelos. H_O: heterozigidade observada H_E: heterozigidade esperada (Nei, 1987).

Os resultados para os testes de desequilíbrio de ligação e para o equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando a correção de Bonferroni mostraram valores maiores que 0,00046 e 0,00185, respectivamente, para pelo menos uma das populações estudadas, indicando que os *loci* não estão ligados e que eles podem ser utilizados como marcadores genéticos independentes.

Sitophilus zeamais é uma espécie praga com grande capacidade de dispersão natural e por ações antrópicas, apresenta sobreposição de gerações e comportamento gregário o que aumenta o acasalamento entre parentes, no entanto, nenhum dos *loci* apresentou desequilíbrio de Hardy-Weinberg o que comprova a neutralidade dos *loci* testados. Já para o teste de alelos nulos, apenas o *locus* 3H6 foi detectada a presença de alelos nulos (Oosterhout = 0,3715) impossibilitando a utilização do mesmo como marcador de variabilidade genética populacional. Desta forma, oito dos dez *loci* testados mostraram-se aptos a serem utilizados como marcadores genéticos de diversidade em populações de *S. zeamais* e o número de alelos encontrado na maioria dos marcadores foi satisfatório para estudos de diversidade genética. Outra característica bastante interessante encontrada neste grupo de marcadores moleculares e que contribuiu para uma forte caracterização da estrutura genética das populações estudadas é a presença de 17 alelos privados dentro das três populações estudadas, sendo cinco em Viçosa, cinco em Mapula e sete em Richvale.

Os testes de transferabilidade para *S. oryzae* demonstraram que os *loci* 1A1, 1E1 e 3G1 foram positivos e polimórficos, os *loci* 1G7 e 3H6 foram positivos (presença de produto PCR) e os *locus* 3A11 e 3G7 não amplificaram (Tabela 2). Já para *S. granarius* os *loci* foram positivos e polimórficos para 1A1, 1E1, 3G1 e 3G7, apenas positivos para os *loci* 1G7, 3A11 e 3H6 e negativos para 1B1 e 1D10 (Tabela 2). Os ensaios de transferabilidade dos primers de microssatélites para *S. oryzae* e *S. granarius* foram positivos para maioria dos *loci*, isso era esperado devido às espécies *Sitophilus* serem muito próximas filogeneticamente formando um grupo monofilético dentro da subfamília

Dyrophthorinae, sendo consideradas espécies irmãs (Hidayat et al., 1996; O'Meara, 2001; Plarre, 2010). Este trabalho reporta os primeiros marcadores moleculares de microssatélites para as espécies do gênero *Sitophilus* e esperamos que estes sejam uteis para a realização de estudos relacionados à diversidade e estrutura genética de populações naturais e que possam futuramente colaborar com programas de manejo destas espécies-praga que são responsáveis pelas principais perdas em cereais armazenados em regiões tropicais.

Tabela 2. Teste de transferibilidade dos nove marcas de microssatélites provenientes do caruncho-do-milho (*S. zeamais*) para caruncho-do-arroz (*S. oryzae*) e para o caruncho-do-trigo (*S. granarius*) (– não aplicaram, + presença de produto de PCR, * Locus polimórficos).

Espécie/Locus	N	1E1	1A1	1B1	1D10	1G7	3A11	3H6	3G1	3G7
<i>S. oryzae</i>	8	*	*	-	-	+	-	+	*	-
<i>S. granarius</i>	8	*	*	-	-	+	+	+	*	*

AGRADECIMENTOS

À Dra A.P. Souza e os integrantes do Laboratório de Análise Genética e Molecular (LAGM) da UNICAMP pelo suporte técnico para a construção da biblioteca genômica enriquecida. Nós também agradecemos a Dra E. Caixeta e aos outros membros do Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (EMBRAPA, Brasil) pelo suporte no uso do sequenciador. E as instituições de fomento FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão de bolsas e financiamento de projetos que permitiram a realização do trabalho.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Athanassiou, C.G.; Steenberg, T. Insecticidal effect of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) in combination with three diatomaceous earth formulations against *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Biological Control* 40, 411-416, 2007.
- Billotte, N.; Lagoda, P.J.L.; Risterucci, A.M.; Baurens, F.C. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54, 277-288, 1999.
- Campbell, J.F. Influence of Seed Size on Exploitation by the Rice Weevil, *Sitophilus oryzae*. *Journal of Insect Behavior* 15, 429-445, 2002.
- Corrêa, A.S.; Pereira, E.J.G.; Cordeiro, E.M.G.; Braga, L.S.; Guedes, R.N.C. Insecticide resistance, mixture potentiation and fitness in populations of the maize weevil (*Sitophilus zeamais*). *Crop Protection* 30, 1655-1666, 2011.
- Goudet, J. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices In <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.html> [ed.]. Lausanne: Department of Ecology & Evolution, 2002.
- Guedes, R.N.C.; Lima, J.O.G.; Santos, J.P.; Cruz, C.D. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 31, 145-150, 1995.
- Lewis, P.; Zaykin, D. Genetic Data Analysis: Computer Program for the Analysis of Allelic Data . Version 1.0. (d16c). Free Program Distributed by the Authors over the Internet from <http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php>. 2001.
- Hagstrum, D.W.; Flinn, P.W.; Howard, R.W. Ecology. In: *Integrated Management of Insects in Stored Products* (eds Hagstrum DW, Subramanyam B), pp. 71-134. Marcel Dekker, New York. 1996.

- Heddi, A.; Grenier, A.M.; Khatchadourian, C.; Charles, H.; Nardon, P. Four intracellular genomes direct weevil biology: Nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and *Wolbachia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 6814-6819, 1999.
- Heddi, A.; Charles, H.; Khatchadourian, C. Intracellular bacterial symbiosis in the genus *Sitophilus*: the 'biological individual' concept revisited. *Research in Microbiology* 152, 431-437, 2001.
- Hidayat, P.; Phillips, T.W.; French-Constant, R.H. Molecular and morphological characters discriminate *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and confirm reproductive isolation. *Annals of the Entomological Society of America* 89, 645-652, 1996.
- Martins, W.S.; Lucas, D.C.S.; Neves, K.F.S.; Bertioli, D.J. WebSat – A Web Software for MicroSatellite Marker Development. *Bioinformatics* 3, 282-283, 2009.
- O'Meara, B. Bacterial Symbiosis and Plant Host Use Evolution in Dryophthorinae (Coleoptera, Curculionidae). A Phylogenetic Study Using Parsimony and Bayesian Analysis. Bachelor thesis, Harvard University, Massachusetts, USA. 2001.
- Phillips, T.W.; Throne, J.E. Biorational Approaches to Managing Stored-Product Insects. *Annual Review Entomology* 55, 375-397, 2010.
- Plarre, R. An attempt to reconstruct the natural and cultural history of the granary weevil, *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). *European Journal of Entomology*, 107, 1-11, 2010.
- Rees, D.P. Coleoptera. In: *Integrated Management of Insects in Stored Products* (eds Subramanyam BH, Hagstrum DW), pp. 1-40. Marcel Dekker, New York. 1996.
- Ribeiro, B.M.; Guedes, R.N.C.; Oliveira, E.E.; Santos, J.P. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais*

- (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 39, 21-31, 2003.
- Rio, R.V.M.; Lefevre, C.; Heddi, A.; Aksoy, S. Comparative Genomics of Insect-Symbiotic Bacteria: Influence of Host Environment on Microbial Genome Composition. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6825-6832, 2003.
- Schlötterer, C. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 5, 63-69, 2004.
- Sousa, A.; Faroni, L.; Totola, M.; Urruchi, W.; Guedes, R.N.C. Ozone as a management alternative against phosphine-resistant insect pests of stored products. *Journal of Stored Products Research* 44, 379-385, 2008.
- Van Oosterhout, C.; Hutchinson, W.F.; Wills, D.P.M.; Shipley, P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4, 535-538, 2004.

Capítulo 3: Evidências moleculares revelam recente colonização global do caruncho-do-milho, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)

Alberto S. Corrêa¹, Christina C. Vinson², Lucas S. Braga¹, Raul Narciso C. Guedes¹, Luiz Orlando de Oliveira²

¹Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, Brazil

²Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, Brazil

(em preparação para submeter à Molecular Ecology)

RESUMO

O caruncho-do-milho, *Sitophilus zeamais*, é uma das principais pragas de grãos armazenados no mundo. No entanto, pouco se sabe sobre os eventos de dispersão e sua distribuição atual e histórica, importantes informações para o sucesso de programas de manejo integrado de praga. Desta forma, utilizamos uma abordagem de filogeografia molecular para determinar a importância dos fatores históricos e causas ecológicas contemporâneas que moldaram a arquitetura genética das populações atuais do caruncho-do-milho existentes no Brasil. Especificamente, os questionamentos são: (1) Qual é a origem do caruncho-do-milho presente no Brasil? (2) Teria sido ele resultante de um único ou de múltiplos eventos de introdução? (3) Existiriam evidências para propor uma hipótese a respeito da dispersão do caruncho-do-milho no Brasil e no mundo? Para isso, utilizamos dados de sequenciamento parcial de dois genes mitocondriais, citocromo c oxidase subunidade I (COI) e citocromo c oxidase subunidade II (COII), de indivíduos de caruncho-do-milho. Também utilizamos dados de marcadores microssatélites no intuito de inferir sobre a diversidade genética e estrutura populacional desta espécie. O total de 18 haplótipos foram evidenciados em 261 indivíduos de *S. zeamais* gerando uma diversidade haplotípica (Hd) de 0,720 e uma diversidade nucleotídica (π) de 0,0012. Estes resultados são característicos de populações em expansão espacial, o que é confirmado pelo padrão unimodal da distribuição de *mismatch*. Não foi possível traçar uma hipótese a respeito da dispersão do caruncho-do-milho no Brasil e mundo. Tanto os dados de sequenciamento quanto os dados de microssatélites

apontaram que a maior parte da diversidade está dentro das populações e não entre as populações. O índice de fixação G_{ST} apontou moderada divergência genética entre as populações quando avaliadas de maneira geral (todos os indivíduos) e baixa divergência genética entre os grupos previamente definidos de acordo com a localização geográfica, o que confirma a presença de fluxo genético entre as áreas de plantios e estocagem de grãos. Este fluxo genético é maior em áreas mais próximas geograficamente indicando que indivíduos mais próximos geograficamente compartilham maior quantidade do material genético. No entanto, o fluxo genético pode ocorrer entre regiões distantes até mesmo entre diferentes continentes, possivelmente pelo transporte de grãos infestados por fases imaturas do inseto. As características aqui relatadas das populações de caruncho-do-milho são bastante preocupantes para os programas de manejo integrado desta espécie, visto que a variabilidade dentro das populações é alta e o fluxo genético entre regiões produtoras é constante o que pode levar o ganho de características comportamentais, ecológicas e fisiológicas que resultem em sérias falhas no combate desta espécie-praga em unidades armazenadoras.

Palavras-chave: Filogeografia, microssatélites, diversidade genética, caruncho-do-milho

1. INTRODUÇÃO

Os carunchos de importância econômica, especialmente aqueles do gênero *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae), tais como *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855, *Sitophilus oryzae* (L., 1763) e *Sitophilus granarius* (L., 1758) causam sérios danos a grãos armazenados. Com o objetivo de elaborar estratégias eficientes de controle destes insetos-praga os carunchos têm sido intensamente estudados sob o ponto de vista ecológico e reprodutivo (Danho et al., 2002; Guedes et al., 2006; Guedes et al., 2010). No entanto, aspectos da história evolutiva e as implicações das ações humanas na dispersão destas espécies de carunchos ainda são assuntos praticamente inexplorados.

O caruncho-do-milho, *S. zeamais*, é a principal praga do milho armazenado e está entre as pragas mais destrutivas em regiões tropicais (Rees, 1996; Danho et al., 2002). É uma praga primária por atacar o grão

intacto (Adda et al., 2002; Brown & Lee, 2002). A fêmea, com suas mandíbulas, abre um orifício no grão e deposita um ovo por orifício, fechando a abertura com uma substância produzida pelo órgão ovipositor (Evans, 1981). As formas jovens se desenvolvem no interior do grão utilizando-o como alimento e abrigo (Evans, 1981). Os indivíduos adultos apresentam grande autonomia de vôo (Hagstrum et al., 1996). Sua dispersão a pequenas distâncias ocorre por insetos adultos que se locomovem entre regiões produtoras e a grandes distâncias ocorre pelo transporte de grãos infestados. Estas características contribuem para que a distribuição contemporânea da diversidade genética do caruncho-do-milho possa apresentar um forte componente que seja reflexo da ocupação e migração humana.

Estudos envolvendo espécies a subfamília Dryophthoridae relacionam o gênero *Sitophilus*, assim como a maioria dos cereais de importância econômica, como oriundo de regiões orientais do planeta (Plarre, 2010; Obata et al., 2011). Esta hipótese sustenta-se devido às florestas subtropicais e temperadas do continente asiático serem locais de grande endemismo de espécies do gênero *Sitophilus*, com exceção para as espécies-praga, *S. zeamais*, *S. oryzae* e *S. granarius*, mundialmente distribuídas, e do *Sitophilus linearis* (Herbst, 1797) que é bastante relacionado a seu hospedeiro, o tamarindo (*Tamarindus indica*). No entanto, o milho (*Zea mays* L.), principal hospedeiro do *S. zeamais*, surgiu em solo centro-americano há aproximadamente 7500 – 1000 anos, nos planaltos do México a oeste da América do Sul, sendo cultivado pelos Astecas, Maias e Incas (Dickau et al., 2007; Piperno et al., 2009).

Informações sobre a diversidade genética com marcadores moleculares entre as áreas de introdução e de origem são importantes parâmetros para revelar os padrões de dispersões de alguns organismos, visto que, o esperado é que apenas uma porção da variabilidade genética total migre das áreas de origem para as regiões recém-colonizadas (Cox, 2004; Puillandre et al., 2008; Valade et al., 2009). Estudos sobre a história evolutiva de populações de

coleópteros-praga ainda são bastante restritos na literatura. Alguns dos importantes trabalhos realizados utilizando dados moleculares foram conduzidas recentemente com populações do besouro-da-batata (*Leptinotarsa decemlineata*) na América do Norte e na Europa (Grapputo et al., 2005), populações do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) no sul dos Estados Unidos (Kim & Sappington, 2006), populações peruanas e mexicanas do caruncho-do-feijão (*Acanthoscelides obtectus*) (Alvarez et al., 2005) e com os besouros-do-pinheiro (*Dendroctonus spp*) no leste e oeste dos Estados Unidos (Schrey et al., 2011).

Filogeografia é o campo de estudo que se preocupa com os princípios e processos que governam as distribuições geográficas das linhagens genealógicas, especialmente aquelas dentro e entre espécies estreitamente relacionadas (Avise, 2000). Análises filogeográficas com insetos têm permitido explicar as divergências de diferentes linhagens de uma espécie e fornecido informações sobre os efeitos do isolamento entre populações no nível molecular (Emerson et al., 1999). Os estudos de filogeografia molecular procuram examinar dados moleculares de populações naturais contemporâneas à procura das marcas evolutivas deixadas no genoma por processos históricos e, deste modo, podem desenvolver e aperfeiçoar hipóteses biogeográficas que sejam capazes de explicar as distribuições geográficas destas linhagens.

Desta forma, o presente estudo usa uma abordagem de filogeografia molecular para determinar a importância dos fatores históricos e causas ecológicas contemporâneas que moldaram a arquitetura genética das populações atuais do caruncho-do-milho existentes no Brasil. Especificamente, as perguntas que aqui pretendemos responder são: (1) Qual é a origem do caruncho-do-milho presente no Brasil? (2) Teria sido ele resultante de um único ou de múltiplos eventos de introdução? (3) Existiriam evidências para propor uma hipótese a respeito da dispersão do caruncho-do-milho no mundo, considerando um cenário de provável interferência antrópica na

dispersão recente da espécie? Para isso, utilizamos dados de sequenciamento parcial de dois genes mitocondriais, citocromo c oxidase subunidade I (COI) e citocromo c oxidase subunidade II (COII), de indivíduos de caruncho-do-milho coletados em áreas representativas da produção mundial de milho. Utilizamos dados de marcadores microssatélites no intuito de inferir sobre a diversidade genética e estrutura populacional desta espécie. Nossa expectativa é que estes estudos poderão contribuir para a elucidação de rotas de dispersão recente e da amplitude da base genética das populações contemporâneas do caruncho-do-milho no Brasil e no mundo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Estratégia de amostragem

Indivíduos de *S. zeamais* foram recebidos de diversas regiões do mundo entre os anos de 2009 e 2012 (Figura 1). Estes foram acondicionados em tubos de vidros, devidamente etiquetados, contendo álcool (etanol) 95% e estocados em freezers a temperatura de -20°C. Este procedimento teve como objetivo conservar os espécimes e, principalmente, manter a integridade do DNA total durante o maior período possível de armazenamento.

Um total de 525 insetos foram utilizados no presente estudo. Destes 261 indivíduos, proveniente de 55 pontos de coleta distintos, foram utilizados para as análises com marcadores de mtDNA. Os 264 indivíduos restantes, provenientes de 11 pontos amostrais, foram utilizados nas análises de marcadores de microssatélites. As coletas dos exemplares de *S. zeamais* foram direcionadas tentando abranger as principais áreas de plantios de cereais no mundo, principalmente do milho, hospedeiro relatado com maior ocorrência de *S. zeamais*.

O maior número de coletas foi realizado no Brasil, importante produtor de grãos e sítio de domesticação secundário do milho, além disso, principal campo de estudo do trabalho. Foram incluídas amostras provenientes das regiões de origem e domesticação do milho, que compreende o Norte da

América do Sul e a Meso-américa, e da Ásia, região de origem do gênero *Sitophilus* e outros cereais como arroz e trigo, que acreditamos serem componentes importantes para a definição da estrutura genética atual das populações do caruncho-do-milho existentes no Brasil. Outras amostras oriundas de locais considerados sítios secundários de dispersão do caruncho-do-milho, como a América do Norte, Europa e África também foram incorporadas nas análises.

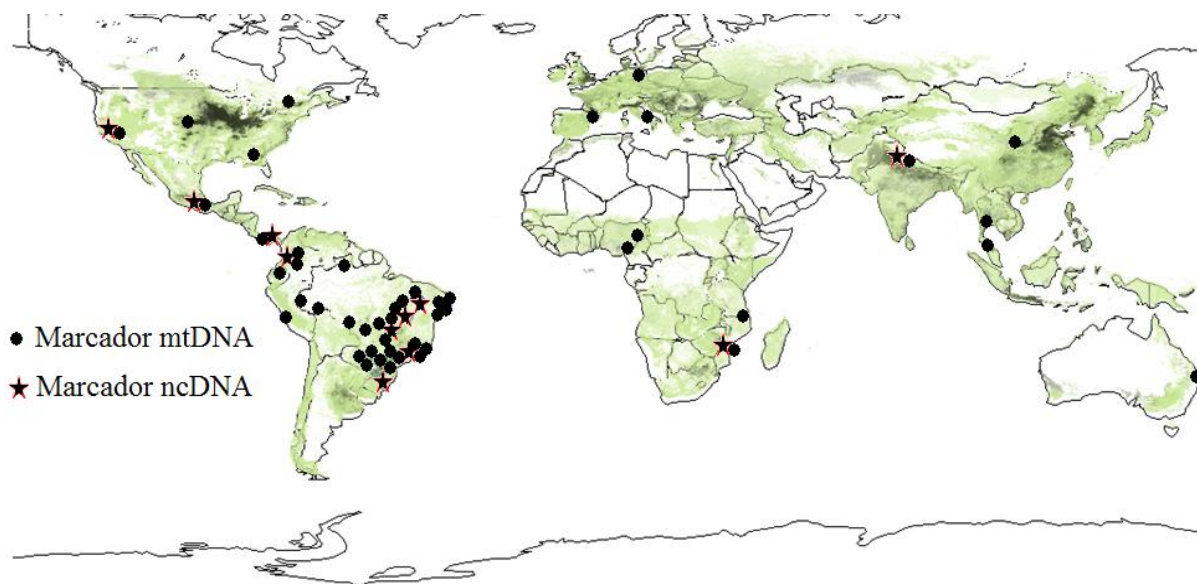


Figura 1. Locais de coleta de indivíduos de *Sitophilus zeamais*. Os hachurados em verde no mapa representam os locais de plantios de cereais (milho, trigo e arroz) no planeta.

2.2. Extração do DNA total

O DNA genômico foi extraído seguindo o método adaptado de Clark et al. (2001). Cada inseto foi macerado individualmente em nitrogênio líquido e adicionando-se 500µL de tampão CTAB (100mM de Tris-HCl, pH 8,0; 1,4M de NaCl; 0,02M de EDTA, pH 8,0; CTAB (2%) e β-mercaptoetanol (0,2%, adicionado separado dos demais componentes do tampão)). Após incubação por 0,5 horas a 65°C adicionou-se 13µL de proteinase K (25 mg/mL, Sigma) e as amostras foram homogeneizadas em agitador tipo vortex e incubadas a

37°C em banho-maria por 1,5 horas. Após o período de incubação, 60 µL de RNase A (10 mg/mL, Sigma) foi adicionada, seguida por nova agitação e incubação a 37°C por 2 horas. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 5 minutos à 12500 rpm e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Ao sobrenadante foi adicionado uma alíquota de 500µL de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1 v/v), seguindo-se de uma nova centrifugação à 12500 rpm por 15 minutos. Novamente transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo e adicionou-se 500µL de isopropanol deixando o mesmo precipitar á 4°C por uma noite. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 12 minutos à 12500 rpm, descartando-se o sobrenadante. Duas lavagens com 500µL de etanol 70% e etanol 95%, respectivamente, foram realizadas. Após a secagem em temperatura ambiente do pellet, este foi ressuscitado em 50µL de tampão TE 0,1M (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA, pH 8,0) por uma noite a 4°C e posteriormente estocado a -20°C.

2.3. Preparo de banco de dados para estudo filogeográfico

Os primers utilizados para amplificação do fragmento do gene COI foram COISz-F (5' - GGGCTGAATTAGGGAATCCT - 3') e COISz-R (5' - CTCCTGTTAATCCCCCGATA - 3') (Corrêa et al., 2013). Os primers para região do COII (COIISz-F 5' - TGCTTCAAGATAGAGCCTCTCC - 3'; COIISz-R 5' - GGTTTGCTCCACAGATTCAG - 3') foram construídos com base na sequencia depositada no NCBI (AY014881) utilizando o aplicativo *Primer 3 v. 0.4.0* (Rozen & Skaletsky, 2000). Para os dois conjuntos de primers as condições de amplificação via PCR foi realizada em um total de 25 uL, contendo 50ng de DNA total, tampão IVB 5X (Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brazil), dNTP (50 uM de cada), 0,5 mM de cada primer (R e F) e 1 U de Taq (Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brazil). Os ciclos de PCR para os dois conjuntos de primers foram iniciados com uma desnaturação de 5 min a 94 °C seguidos por 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 45 s e 72 °C por 1,5 min e uma extensão final a 72 °C por 10 min usando termociclador modelo Vapo

Protect (Eppendorf, Hamburg, Germany). Foi aplicado 5 μ l do produto da PCR em gel de agarose (1,0 %) e visualizado sob luz ultravioleta e suas imagens digitalizadas em um sistema de captura de imagens (Eagle Eye, Stratagene, La Jolla, CA, USA). Posteriormente o processo de purificação foi realizado com enzima *ExoSap* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) na proporção de 2,0 uL para cada de 10 uL de produto de PCR e o sequenciamento das amostras foi terceirizado pela empresa MACROGEN INC., (Seul, Coreia do Sul).

Os dados de sequenciamento foram alinhados e editados manualmente no aplicativo Sequencher 4.0.1 (Gene Codes Corp. Ann Harbor, MI, USA). Não houve presença de inserções ou deleções nas sequências obtidas. As sequências continham em 806 pb para COI e 551 pb para COII no intuito de eliminar os dados ausentes. Para as análises subsequentes realizamos a concatenação dos genes mitocondriais (COI-COII) e dividimos as populações em cinco grupos que consideram principalmente a distribuição geográfica dos indivíduos de *S. zeamais*. O grupo do Brasil foi formado pelos locais de coleta dentro do território brasileiro e do Paraguai; o Grupo de Origem e Diversidade do Milho (ODM) foi formado por locais de coleta que compreende a Colômbia, Peru, Panamá e México; o Grupo da América do Norte é formado pelas populações localizadas no EUA e a população do Canadá; o Grupo da Europa/África compreende as populações destes dois continentes; e o Grupo da Ásia por populações provenientes do continente asiático e uma população da Austrália.

O número de haplótipos (H), a diversidade haplotípica (H_d), a diversidade nucleotídica (π) e o número médio de diferenças nucleotídicas (S) foram estimados através do aplicativo computacional DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009). Utilizando o aplicativo computacional Arlequin 3.0.1 (Excoffier et al., 2005) realizamos os testes de neutralidade de F_s de Fu (Fu, 1997) e o D de Tajima (Tajima, 1989). Ambos os testes são baseados no modelo de sítios infinitos sem recombinação e revelam padrões de mutações aleatórias (neutras) daquelas não aleatórias advindas de processos de seleção ou

expansão populacional. Valores negativos e significativos de D ou F_s indicam excesso de polimorfismo de baixa frequência e suporta a hipótese de expansão populacional ou de seleção purificadora, já valores positivos e significativos de D ou F_s significa que o polimorfismo de baixa frequência é menor que o esperado e aponta para fenômenos de gargalo genético ou de equilíbrio de seleção. Os valores não significativos são consistentes com a hipótese evolução neutra do DNA. Ambos os testes foram realizados com 1000 permutações utilizando simulações de coalescência e utilizando na opção “*Haplotype Definition*” o modelo de “*Infer from distance matrix*”. Seguindo as recomendações do Arlequin a estatística F_s de F_u só é considerada significativa 95% de confiança, quando o seu P -valor é inferior a 0,02.

Também no Arlequin foi realizada análise de distribuição de *mismatch* para verificar uma possível expansão/regressão espacial dos indivíduos do caruncho-do-milho (Rogers & Harpending, 1992). Este modelo assume que populações recentemente subdivididas expandem no tempo e no espaço aumento o número de indivíduos (Ray et al., 2003). Desta forma, populações em equilíbrio longo e estável devem apresentar um padrão multimodal, enquanto que populações que experimentaram uma expansão recente apresentam geralmente uma distribuição unimodal (Rogers & Harpending, 1992). A análise foi realizada utilizando o modelo de expansão espacial com 1000 permutações e intervalo de 95% de confiabilidade.

No Arlequin também estimamos através da AMOVA (Excoffier et al., 1992) os parâmetros de variância molecular Φ_{st} , Φ_{ct} e Φ_{sc} de acordo com os grupos previamente definidos por sua distribuição geográfica, como citado anteriormente. O valor estatístico Φ_{st} , que é definido como a correlação entre haplótipos retirados ao acaso dentro de uma população em relação ao total de haplótipos do organismo estudado, gerando uma medida de variância entre as populações (localidades) estudadas. O Φ_{ct} que é definido como a correlação entre haplótipos retirados ao acaso dentro de um grupo da população em relação ao total de haplótipos do organismo estudado, estimando a

variabilidade genética dentro das populações (localidades) estudadas e o Φ_{sc} que é definido como a correlação entre haplótipos retirados ao acaso de dentro de um grupo de populações em relação ao total de haplótipos do organismo estudado de uma região, ou seja avalia a variabilidade dentro populações (localidades) estudadas (Excoffier et al., 1992)

Para estabelecer as conexões genéticas entre haplótipos e tentar reescrever as possíveis rotas de dispersões do caruncho-do-milho, nós construímos redes de haplótipos baseadas na estatística de máxima parcimônia (Templeton et al., 1992), utilizando o aplicativo computacional TCS 1.21 (Clement et al., 2000), e na estatística de “*Median Joining*” (Bandelt et al., 1999) utilizando o aplicativo computacional NETWORK 4.5.0.2 (Fluxus Technology, Sudbury, UK). As ambiguidades geradas foram resolvidas pelos critérios baseados na geografia das populações e na teoria da coalescência como proposto por Crandall & Templeton (1993).

2.4. Preparo de banco de dados para estudos populacionais

Os dados de microssatélites foram coletados em 264 indivíduos de caruncho-do-milho (*S. zeamais*), obtidos em 11 locais de coleta (Figura 1). Os marcadores utilizados, as condições de amplificação e o processo de genotipagem foram os mesmos desenvolvidos e descritos por Corrêa et al. (2012).

Identificação e edição dos fragmentos foi realizada no programa GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems), os testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação foram estimados pelo programa F_{STAT} (Goudet, 2002) e a frequência de alelos nulos utilizando o aplicativo MICRO-CHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004). Também foi estimado o número de alelos por locus, número de alelos privados, a heterozigosidade média observada, a heterozigosidade média esperada para cada população foi estimado utilizando o programa GDA versão 1.1 (Genetic Data Analysis) (Lewis & Zaykin 2001).

Para as análises entre populações foram estimados os índices de fixação dentro das populações (F_{IS}), índice de fixação total (F_{IT}) e divergência genética entre populações (F_{ST}) (Weir & Cockerham, 1984), além do índice G_{ST} (Nei, 1973) e a estimativa R_{ST} (Slatkin, 1995) utilizando o software F_{STAT} (Goudet, 2002). Para estas análises foi utilizado o método de reamostragem “bootstrap”, com 95% de intervalo de confiança, com 1000 permutações. Análises de variância molecular (AMOVA), para diferenças intra e interpopulacional, foram realizadas com o aplicativo Arlequin 3.1.0 (Excoffier et al., 2006) os parâmetros de variância molecular Φ_{st} , Φ_{ct} e Φ_{sc} (descritos anteriormente) com significância testada de 1000 permutações. Também foi obtida uma matriz de pares de F_{ST} (Weir & Hill, 2002) entre as 11 populações com o fluxo gênico médio estimado a partir de $Nm=[1/(F_{ST} - 1)]/4$ (Whitlock & Mccauley, 1999) e o número absoluto de migrantes ($M=2Nm$) entre as populações estimados com base no F_{ST} (Excoffier et al., 2006). Posteriormente, uma árvore de *Neighbor-Joining*, gerada com base na distância genética D_A (Nei et al., 1983), foi construída com o aplicativo computacional *Populations* 1.2.3.0 (Langella, 1999), também com significância testada de 1000 permutações.

Utilizando o aplicativo Structure v.2.3.4 (Pritchard et al., 2000) nós ainda exploramos a distribuição de variação genética do caruncho-do-milho através de uma estimativa do número de grupos bayesianos (K) que abrangesse os 11 locais de amostragem genotipados. Este aplicativo utiliza uma abordagem Bayesiana, baseado na cadeia de *Monte Carlo Markov* (MCMC), que agrupa indivíduos dentro de grupos (K) que privilegiam o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação entre os marcadores dentro do mesmo grupo. Para isso, realizamos 20 corridas, com um *burnin* conjunto de 250.000 replicações seguidas por 750.000 de passos de MCMC para um número de grupos variando de K=2 a K=14. Para a obtenção do melhor K, utilizamos os critérios de $\ln [\Pr (X|K)]$ (Pritchard et al., 2000) e ΔK (Evanno et al., 2005).

3. RESULTADOS

3.1. Análise do mtDNA para *S. zeamais*

O total de 18 haplótipos evidenciados nos 261 indivíduos de *S. zeamais* sequenciados, gerou uma diversidade haplotípica (Hd) de 0,720, uma diversidade nucleotídica (π) de 0,0012 e um número médio de diferenças nucleotídicas (k) igual a 1,679 (Tabela 1). Já as medidas de diversidade nucleotídicas (Hd , π e k), geradas para cada grupo previamente determinado de acordo com a origem geográfica, não demonstraram diferenças importantes entre os grupos estudados. No entanto, aparentemente os grupos do Brasil e da Ásia mostraram maior diversidade haplotípica em relação aos grupos da América do Norte, ODM e Europa/África (Tabela 1).

Os testes de neutralidade, D de Tajima e F_s de Fu, não foram significativos avaliando-se os indivíduos como um todo ou quando divididos em grupos (Tabela 1). Estes resultados indicam que os polimorfismos encontrados estão de acordo com o modelo de neutralidade proposto por Tajima (1989) e que as populações de *S. zeamais* estudadas de maneira geral não se encontram em condições expansão populacional (Fu, 1997), o mesmo acontecendo quando divididas em grupos (Tabela 1).

Os gráficos de distribuição *mismatch* para os valores observados e simulados para expansão espacial não foram significativos para os indivíduos de *S. zeamais* quando avaliados como um todo ou quando divididos em grupos ($SSD < 0,02681$, $p > 0,16$; $Ragdeness < 0,21216$, $p > 0,38$) (Figura 2). Este resultado é um indício de expansão/regressão espacial de *S. zeamais* nos locais amostrados, visto que a hipótese nula de padrão unimodal das curvas não foi rejeitada.

Tabela 1. Medidas de diversidade nucleotídica e testes estatísticos de neutralidade para fragmentos concatenados dos genes mitocondriais citocromo oxidase c subunidade I e citocromo oxidase c subunidade II (COI-COII) de *Sitophilus zeamais*.

Grupos	Tamanho amostral	Número de haplótipos (H)	Diversidade de haplótipos (H_d)	Diversidade nucleotídica (π)	Número médio de diferenças nucleotídicas (k)	Número de sítios variáveis (S)	D de Tajima (p valor)	Fs de Fu (p valor)
Geral	261	18	0,720	0,0012	1,679	16	-0,892 (=0,19)	-6,371 (=0,03)
Brasil	143	8	0,704	0,0013	1,766	10	-0,055 (=0,53)	0,465 (=0,62)
ODM	37	5	0,553	0,0005	0,718	4	-0,611 (=0,31)	-1.292 (=0,18)
A. do Norte	20	4	0,500	0,0010	1,400	6	-0,549 (=0,30)	0,803 (=0,68)
Europa/África	30	4	0,586	0,0007	0,915	4	-0,241 (=0,44)	0,187 (=0,53)
Ásia	31	7	0,712	0,0009	1,234	6	-0,504 (=0,34)	-1,950 (=0,12)

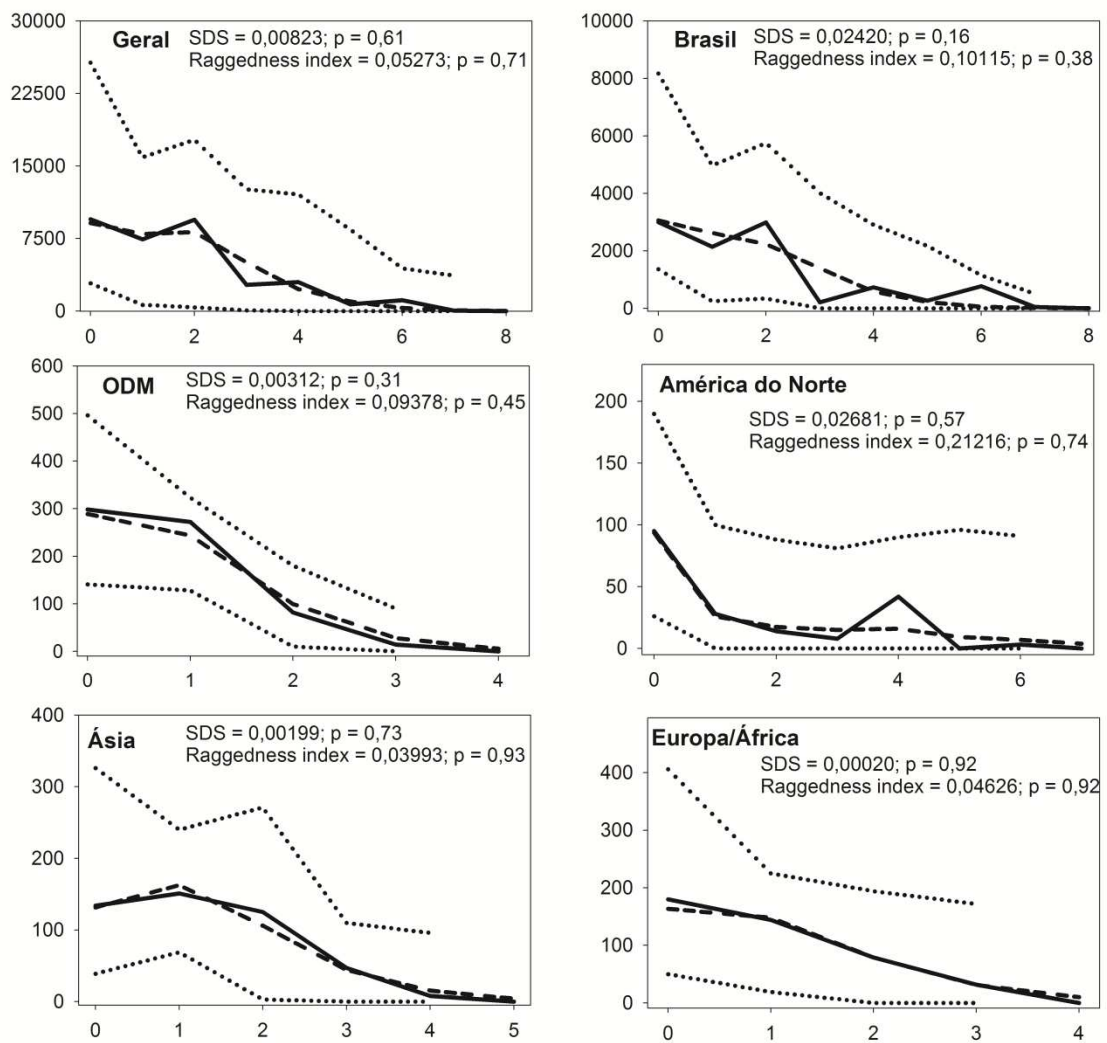


Figura 2. Distribuição espacial de *mismatch* para os indivíduos de *S. zeamais* como um todo ou quando divididos em grupos de acordo com os locais de coleta. As análises foram geradas com intervalo de confiança de 95% e 1000 replicações de *bootstrap*. Linhas sólidas (—) valores observados; linhas interrompidas (---) valores esperados e linhas pontilhadas (.....) intervalo de confiança 95%.

A análise de variância molecular (AMOVA) dos haplótipos encontrados nos indivíduos de *S. zeamais* considerando dois níveis hierárquicos indicou elevada variação dentro dos grupos (79,06%, $\Phi_{ST} = 0,209$) e consequente baixa variação entre os grupos (20,94%). Quando a AMOVA foi dividida em grupos (três níveis hierárquicos) de acordo com a distribuição geográfica dos indivíduos, a maior parte da variação ainda ficou dentro das populações (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância molecular (AMOVA) para estrutura genética de populações de *S. zeamais* utilizando marcadores mitocondriais.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Componente de variância	Variância (%)	Índice de Fixação
Dois níveis hierárquicos					
Entre grupos	4	38,87	0,1896 Va	20,94	$\Phi_{ST}=0,209$
Dentro dos grupos	256	183,35	0,7192 Vb	79,06	
Total	260	218,23	0,9055		
Grupo Brasil vs geral					
Entre grupos	1	29,97	0,2064 Va	21,63	$\Phi_{CT}=0,216$
Entre populações dentro de grupos	3	4,89	0,0315 Vb	3,30	$\Phi_{SC}=0,042$
Dentro de populações	256	183,35	0,7162 Vc	75,06	$\Phi_{ST}=0,249$
Total	260	218,23	0,9541		
Grupo ODM vs geral					
Entre grupos	1	7,81	-0,0357 Va	-4,05	$\Phi_{CT}=-0,040$
Entre populações dentro de grupos	3	4,89	0,2031 Vb	22,99	$\Phi_{SC}=0,221$
Dentro de populações	256	183,35	0,7162 Vc	81,06	$\Phi_{ST}=0,189$
Total	260	218,23	0,8836		
Grupo Ásia vs geral					
Entre grupos	1	6,79	-0,0325Va	-3,69	$\Phi_{CT}=-0,036$
Entre populações dentro de grupos	3	28,07	0,2002Vb	22,65	$\Phi_{SC}=0,219$
Dentro de populações	256	183,35	0,7162 Vc	81,03	$\Phi_{ST}=0,190$
Total	260	218,23	0,8838		
Grupo Velho mundo vs novo Mundo					
Entre grupos	1	12,74	0,0403Va	4,37	$\Phi_{CT}=0,043$
Entre populações dentro de grupos	3	22,12	0,1673Vb	18,11	$\Phi_{SC}=0,189$
Dentro de populações	256	183,35	0,7162 Vc	77,52	$\Phi_{ST}=0,225$
Total	260	218,23	0,9239		

A análise da rede de haplótipos gerou um total de 18 haplótipos nos 261 indivíduos de *S. zeamais* analisados dentro dos 55 locais de coleta (Tabela 3 e Tabela 4). O haplótipo H1 foi o mais frequente, presente em 47,5% dos indivíduos de *S. zeamais* amostrados, e amplamente distribuído em todos os grupos amostrados. O haplótipo H2 foi presente em maior número no grupo do Brasil, mas também ocorreu em indivíduos de Richvale, CA, EUA (grupo da América do Norte). O mesmo ocorre com o haplótipo H3 que é presente em indivíduos no grupo do Brasil, no grupo de origem e domesticação do milho-ODM (Lima, Peru) e no grupo da Europa/África (Maputo, Moçambique). O haplótipo H4 também teve alta frequência com 20,7% dos indivíduos amostrados, no entanto, assim como os haplótipos H5, H6, H7 e H8 foram restritos ao grupo formado por indivíduos coletados no território brasileiro (Tabela 4). Os haplótipos H9 e H10 são restritos ao grupo de origem e domesticação do milho (ODM) e o haplótipo H11 é encontrado em indivíduos do Villa de Leyva, Colômbia (grupo ODM) e Mapula, Moçambique (grupo Europa/África). O haplótipo H13 possui indivíduos representantes nos grupos da América do Norte, Europa/África e Ásia. Já os haplótipos H14, H15, H16, H17 e H18 são restritos a indivíduos coletados no grupo da Ásia (Tabela 4).

Tabela 3: Locais de origem e haplótipos mitocondriais (COI-COII) de *S. zeamais*.

Local de origem	Haplótipos (n)	Latitude	Longitude
<i>GRUPO DO BRASIL</i>			
Eldorado do Sul, RS, Brasil	H1 (6)	30° 05' 52" S	51° 39' 08" W
Passo Fundo, RS, Brasil	H1 (5)	28° 13' 49" S	52° 24' 14" W
Tunápolis, SC, Brasil	H1 (5)	26° 58' 08" S	53° 38' 20" W
Guarapuava, PR, Brasil	H1 (1), H4 (4)	25° 23' 42" S	51° 27' 48" W
Jacarezinho, PR, Brasil	H3 (5), H4 (1)	23° 09' 39" S	49° 58' 08" W
S.J. do Rio Pardo, SP, Brasil	H1 (5)	21° 35' 45" S	46° 53' 20" W
Votuporanga, SP, Brasil	H2 (1), H3 (1), H4 (3)	20° 25' 22" S	49° 58' 22" W
Juiz de Fora, MG, Brasil	H3 (5)	21° 40' 20" S	43° 20' 40" W
Canaã, MG, Brasil	H2 (5)	20° 41' 09" S	42° 37' 12" W
Sete Lagoas, MG, Brasil	H4 (6)	19° 27' 57" S	44° 14' 49" W
Maracaju, MS, Brasil	H1 (3)	21° 36' 50" S	55° 10' 04" W
Vicentina, MS, Brasil	H2 (7)	22° 24' 32" S	54° 26' 09" W
Cuiabá, MT, Brasil	H1 (1), H4 (1), H8 (1)	15° 35' 45" S	56° 05' 49" W
Água Boa, MT, Brasil	H1 (1), H4 (3)	14° 03' 00" S	52° 09' 39" W
Rio Verde, GO, Brasil	H4 (7)	17° 47' 52" S	50° 55' 40" W
Turvânia, GO, Brasil	H1 (3), H2 (1)	16° 36' 50" S	50° 08' 02" W
Barreiras, BA, Brasil	H4 (4)	12° 09' 10" S	44° 59' 24" W
Teresina, PI, Brasil	H4 (4)	05° 05' 20" S	42° 48' 07" W
Balsas, MA, Brasil	H3 (1), H4 (3)	07° 31' 58" S	46° 02' 09" W
São Cristovão, SE, Brasil	H1 (1), H4 (4)	11° 00' 54" S	37° 12' 21" W
Maragogi, AL, Brasil	H4 (1), H5 (2), H6 (1), H7 (1)	09° 00' 44" S	35° 13' 21" W
São João, PE, Brasil	H3 (2), H4 (4)	08° 52' 33" S	36° 22' 01" W
João Pessoa, PB, Brasil	H3 (2)	07° 05' 00" S	34° 50' 00" W
Gurupi, TO, Brasil	H4 (5)	11° 43' 44" S	49° 04' 08" W
Vilhena, RO, Brasil	H1 (5)	12° 47' 19" S	60° 05' 39" W
Cruzeiro do Sul, AC, Brasil	H1 (2), H3 (1), H4 (2)	07° 37' 51" S	72° 40' 12" W
Rio Branco, AC, Brasil	H1 (1), H3 (2), H4 (3)	09° 58' 30" S	67° 48' 36" W
Pedro J. Caballero, Paraguai	H1 (7)	22° 34' 50" S	55° 37' 17" W
Amambay, Paraguai	H1 (6)	22° 17' 00" S	56° 33' 00" W
<i>GRUPO DE ORIGEM E DOMESTICAÇÃO DO MILHO (ODM)</i>			
Ciudad Panama, Panamá	H1 (9)	08° 58' 40" N	79° 32' 23" W
El Manzano, Colômbia	H1 (3), H9 (1)	04° 40' 31" N	73° 52' 45" W
Villa de Leyva, Colômbia	H9 (3), H11 (2)	05° 38' 00" N	73° 32' 00" W
La Hormiga, Colômbia	H1 (4)	00° 25' 00" N	76° 54' 00" W
Lima, Peru	H1 (4), H3 (1)	12° 02' 06" S	77° 01' 07" W
Tlatizapán, México	H1 (4), H10 (6)	18° 41' 00" N	99° 07' 00" W

Continuação Tabela 3

Local de origem	Haplótipos (n)	Latitude	Longitude
<i>GRUPO DA AMÉRICA DO NORTE</i>			
Richvale1, CA, EUA	H1(1), H2 (1), H13 (2)	39° 28' 38" N	121° 44' 41" W
Richvale2, CA, EUA	H1 (2), H2 (2),	39° 28' 38" N	121° 44' 41" W
Tift, GEO, EUA	H1(5), H12 (1)	31° 29' 45" N	83° 31' 35" W
Manhattan, KS, EUA	H1 (2)	39° 11' 30" N	96° 35' 30" W
Ottawa, Canadá	H1 (4)	45° 25' 24" N	75° 40' 24" W
<i>GRUPO DA EUROPA/ÁFRICA</i>			
Maputo, MP, Moçambique	H1 (6), H3 (1)	18° 35' 00" S	32° 35' 00" E
Mapula, CD, Moçambique	H11 (4)	11° 92' 05" S	39° 81' 96" E
Bangangte, Camarões	H1 (4)	05° 08' 27" N	10° 31' 11" E
Garoua, Camarões	H1 (4)	09° 18' 00" N	13° 24' 00" W
Berlin, Alemanha	H1 (4)	52° 31' 00" N	13° 23' 40" E
Campobasso, Itália	H13 (3)	41° 34' 00" N	14° 40' 00" E
Barcelona, Espanha	H13 (4)	41° 23' 20" N	02° 09' 32" E
<i>GRUPO DA ÁSIA</i>			
Shimla, Índia	H1 (9)	31° 06' 12" N	77° 10' 20" E
Yangling, China	H13 (3), H17(3)	34° 17' 00" N	108° 03' 42" E
Pathum Thani, Tailândia	H1 (1), H15 (3), H16 (1)	14° 01' 15" N	100° 31' 29" E
Bangkok1, Tailândia	H1 (4)	13° 45' 08" N	100° 29' 38" E
Bangkok2, Tailândia	H18 (3)	13° 45' 08" N	100° 29' 38" E
Brisbane, Austrália	H1 (2), H14 (4)	27° 28' 22" S	153° 01' 40" E

n = Número de indivíduos

Tabela 4. Representação e distribuição dos 18 haplótipos de indivíduos de *S. zeamais* encontrados em cada um dos cinco grupos definidos de acordo com a distribuição geográfica.

H	N	1111111 1112345660000122 1363355883668625 8239132573691125	Grupo do Brasil	Grupo ODM	Grupo da A. do Norte	Grupo da Europa/África	Grupo da Ásia	* N de grupos amostrados
H1	124	TGTCAGAGAGTTTGTA	52	24	14	18	16	5
H2	17AC..AC.	14	-	3	-	-	2
H3	20	C.....	18	1	-	1	-	3
H4	54	C.....T.....	54	-	-	-	-	1
H5	2	C.....T...C...	2	-	-	-	-	1
H6	1	C.....G.....	1	-	-	-	-	1
H7	1	C.....AT.....	1	-	-	-	-	1
H8	1	.A.....	1	-	-	-	-	1
H9	4	..C.....	-	4	-	-	-	1
H10	6A.....	-	6	-	-	-	1
H11	6	..C.....G	-	2	-	4	-	2
H12	1	.A..T.....	-	-	1	-	-	1
H13	11A.....	-	-	2	7	2	3
H14	4T.....	-	-	-	-	4	1
H15	3G	-	-	-	-	3	1
H16	1	...T.....G	-	-	-	-	1	1
H17	2A...A.....	-	-	-	-	2	1
H18	3	...T.....C.....	-	-	-	-	3	1
Número de Haplótipos			8	5	4	4	7	
Número total de indivíduos			143	37	20	30	31	

H: Haplótipo; N: Número total do haplótipo; NAHG: * Número de grupos que cada haplótipo foi amostrado.

Ambos os métodos de confecção da rede de haplótipos, máxima parcimônia (TCS) e *Median Joining* (NETWORK), geraram redes exatamente com a mesma configuração para os haplótipos mitocondriais encontrados nos indivíduos de *S. zeamais* (Figura 3). O haplótipo H1 está presente na região central da rede, é o mais frequente e é amplamente distribuído no mundo. Essas características possibilitam sugerir o mesmo como haplótipo ancestral dentro do conjunto de haplótipos amostrados de *S. zeamais* (Figura 3). A rede ainda possui quatro ambiguidades resolvidas de acordo com os critérios de Crandall & Templeton (1993). A ambiguidade gerada pelos haplótipos H15, H16 e haplótipo faltante foi resolvida considerando que H15 e H16 pertencem a mesma população Pathum Thani (Tailândia) Ambiguidade entre os haplótipos H9, H11 e H15 foi resolvida pelos mesmos critérios da ambiguidade anterior visto que os haplótipos H9 e H11 pertencem a população de Villa de Leyva (Colômbia), o mesmo ocorrendo para a ambiguidade entre os haplótipos H10, H13 e H17; já que os haplótipos H13 e H17 pertencem a população de Yangling (China). A ambiguidade entre os haplótipos H8, H12 e H14 foi resolvida pelo critério de frequência e assim os haplótipos H12 e H14 permaneceram ligados.

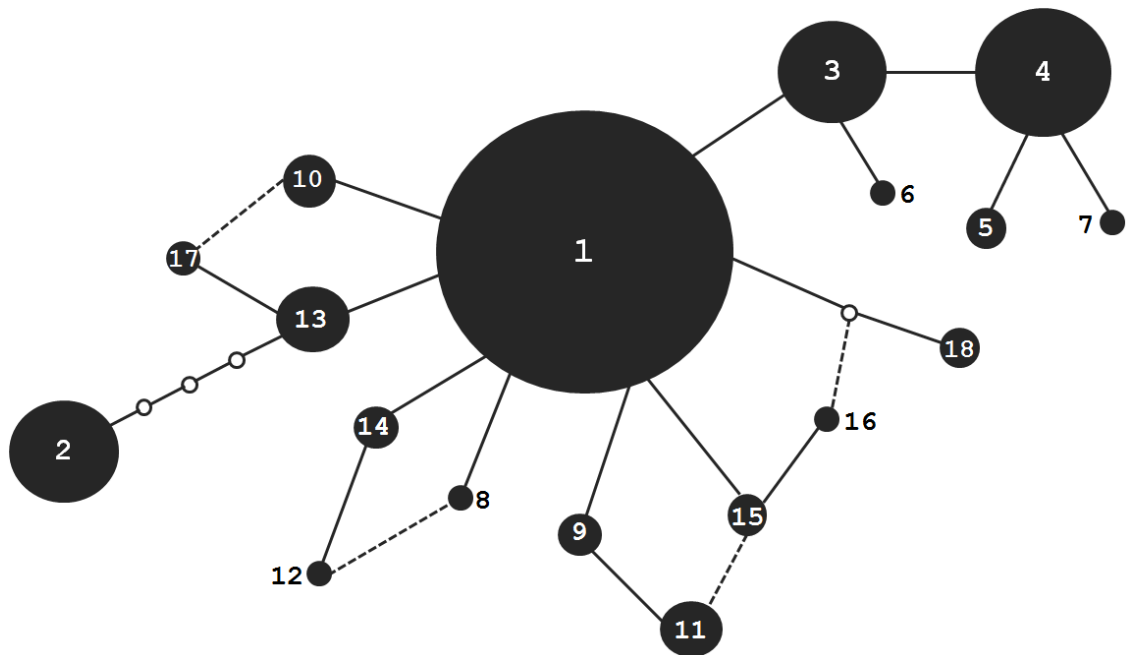


Figura 3. Rede de haplótipos da concatenação dos genes COI e COII de *S. zeamais* gerada pelos aplicativos computacionais TCS e NETWORK. Os números descritos referem-se aos haplótipos das sequências descritas na Tabela 4. Cada linha sólida representa um evento de mutação e as linhas pontilhadas representam homoplasias resolvidas pelos critérios de Crandall & Templeton (1993) e os círculos vazios haplótipos não amostrados ou extintos.

3.2. Marcadores de microssatélites

Dos 10 marcadores de microssatélites descritos e otimizados por Corrêa et al. (2012) três não foram utilizados nas análises subsequentes. O *locus* 1B10, como descrito por Corrêa et al., (2012), se mostrou monomórfico para os indivíduos aqui testados. O *locus* 1B1 apresentou sérias falhas de amplificação, sendo assim optamos por não utilizá-lo nas análises subsequentes. O *locus* 1A1 apresentou alta frequência de alelos nulos nas populações testadas (Oosterhout = 0,2723) o que impossibilita a utilização do mesmo como marcador de variabilidade genética populacional devido a indivíduos heterozigotos serem erroneamente identificados como homozigotos para os *loci* onde a presença deste tipo de alelos é confirmada. Os resultados para os testes de desequilíbrio de ligação e para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, após

a correção de Bonferroni apresentaram valores maiores que 0,00065 e 0,002381, respectivamente, para pelo menos uma das populações estudadas. Assim eles podem ser utilizados como marcadores genéticos independentes e neutros como é desejável em estudos de variabilidade genética.

Os indivíduos dos 11 locais amostrados apresentaram um baixo número médio de alelos por locus de 3,58 com baixa heterozigosidade média esperada e variando de 0,55 e 0,44, respectivamente (Tabela 5). Não houve grande amplitude nos resultados apresentados indicando diversidade similar entre os locais estudados (Tabela 5). Com exceção da CON, todas as populações registraram uma maior heterozigosidade esperada (H_e) em relação a observada (H_o) apresentando um maior número de homozigotos nas populações do que o esperado pelo HWE. No entanto, foram encontrados 15 alelos privados divididos entre os indivíduos de ELD (5), VIC (2), PLA (1), PAL (1), MEX (1), COB (1), CAL (1) e MOC (3) o que contribui para diferenciação genética entre as populações estudadas (Tabela 5).

Tabela 5. Características das 11 populações amostradas de *S. zeamais*, para sete locos polimórficos de microsatélite: tamanho médio da amostra sobre todos os locos (n); número médio de alelos por locos ($A/loco$); número de alelos privados ($A_{PRIV.}$); heterozigosidade esperada (H_E); heterozigosidade observada (H_O); e coeficiente de endogamia (F_{IS}) (Wright, 1951).

População (código)	n	$A/loco$	$A_{PRIV.}$	H_E	H_O	F_{IS}
Brasil						
Eldorado do Sul, RS, Brasil (ELD)	21,00	5,00	5	0,63	0,42	0,34
Viçosa, MG, Brasil (VIC)	20,29	3,86	2	0,64	0,39	0,38
Planaltina, DF, Brasil (PLA)	22,14	3,71	1	0,61	0,33	0,46
Palmas, TO, Brasil (PAL)	20,71	3,86	1	0,59	0,49	0,17
Colônia do Piauí, PI, Brasil (CON)	22,29	3,57	0	0,56	0,58	-0,03
Média	21,29	4,00	9*	0,61	0,46	0,27
Origem e Diversidade do Milho						
Tlatizapán, México (MEX)	20,50	3,00	1	0,59	0,52	0,12
Ciudad Panama, Panamá (PAN)	19,00	3,71	0	0,56	0,35	0,36
La Hormiga, Colômbia (COB)	19,57	3,00	1	0,43	0,32	0,27
Média	19,69	3,24	2*	0,52	0,40	0,24
América do Norte						
Richvale, CA, EUA (CAL)	20,86	3,43	1	0,51	0,43	0,17
Ásia						
Shimla, Índia (IND)	20,29	3,00	0	0,57	0,53	0,07
África						
Mapula, CD, Moçambique (MOC)	21,57	3,29	3	0,59	0,52	-0,19
MÉDIA	20,75	3,58	15**	0,55	0,44	0,20

* Refere-se a soma dos alelos privados; ** Refere-se a soma de todos os alelos privados

A análise de variância molecular (AMOVA) demonstrou que nos 11 locais estudados a maior parte da diversidade está dentro das populações (86,59%, $\Phi_{ST}=0,134$). Quando subdividimos os locais amostrados em grupos, a maior parte da variação ainda foi alojada dentro de populações (85,80%, $\Phi_{ST}=0,142$), sendo apenas 4,10% e 10,11% da variabilidade explicada entre os

cinco grupos e entre populações dentro do mesmo grupo, respectivamente (Tabela 6).

Avaliamos ainda a contribuição dos grupos na estrutura genética dos indivíduos amostrados, no entanto, a maior parte da variabilidade ainda continuou sendo explicada dentro das populações (Tabela 6), confirmando a baixa diferença genética entre as populações dos locais amostrados.

Tabela 6. Análise de variância molecular (AMOVA) para estrutura genética de populações de *S. zeamais* utilizando marcadores de microssatélites.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	Índice de Fixação	Variância (%)
Dois níveis hierárquicos					
Entre populações	10	119,34	0,2566 Va	$\Phi_{ST}=0,134$	13,41
Dentro de populações	517	726,32	1,6583 Vb		86,59
Total	527	845,67	1,9150		
Três níveis hierárquicos					
Entre os cinco grupos	4	63,31	0,0791Va	$\Phi_{CT}=0,041$	4,10
Entre populações dentro de grupos	6	56,04	0,1954Vb	$\Phi_{SC}=0,105$	10,11
Dentro de populações	517	726,32	1,6583Vc	$\Phi_{ST}=0,142$	85,80
Total	527	845,67	1,9328		

De acordo com os índices de diversidade, a diferença genética entre os 11 locais estudados é moderada ($G_{ST}=0,108$; $F_{ST}=0,121$). Já quando dividimos em grupos, de acordo com a localização geográfica, os locais de coleta dentro do grupo ODM ($n = 3$) apresenta diferença moderada entre as populações ($G_{ST} = 0,123$; $F_{ST} = 0,192$), enquanto os locais de coleta dentro do grupo do Brasil ($n = 5$) apresentam baixa diferença genética entre as populações estudadas ($G_{ST} = 0,032$; $F_{ST} = 0,041$). Também existe baixa diferenciação genética quando avaliamos a diferença entre grupos: Brasil vs geral e ODM vs geral (Tabela 7). O coeficiente de autozigosidade (F_{IT}) e o coeficiente de endogamia (F_{IS}) não

variaram entre as populações, com valores positivos e superiores a 0,29 e 0,2 respectivamente, mostrando que existe um nível significativo de endogamia dos indivíduos estudados (Tabela 7).

Tabela 7. Índices de diversidade genética G_{ST} (Nei, 1973); F_{IT} , F_{ST} e F_{IS} (Weir & Cockerham, 1984) e R_{ST} (Slatkin, 1995) obtidos no F_{STAT} para diferentes grupos de dados.

Grupo (tamanho)	G_{ST}	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}	$R_{ST(goodman)}$
Geral (11)	0,108	0,299*	0,121*	0,203 ^{ns}	0,09
Brasil (5)	0,032	0,297*	0,041*	0,267*	0,03
ODM (3)	0,123	0,400*	0,192*	0,258*	0,15
Brasil vs geral	0,023	0,307*	0,045*	0,275*	0,03
ODM vs geral	0,017	0,306*	0,034*	0,282*	0,02

* Significativo a $p < 0,05$;

A tabela 8 mostra as divergências genéticas e a análise do número de migrantes ($M=2Nm$) entre as populações estudadas, utilizando o índice F_{ST} (Weir & Hill, 2002), através de comparações de pares a pares ($p < 0,05$). Os dados das divergências genéticas e da estimativa do número de migrantes são inversamente correlacionadas, uma vez que quanto menor a distância genética entre duas populações, maior tende a ser número de migrantes entre elas. A população mais divergente foi aquela proveniente de indivíduos coletados em COB com F_{ST} significativo quando comparado a todas as outras populações e variando entre 0,1125 a 0,2568 e a maior divergência encontrada foi entre as populações de CAL e MOC com F_{ST} estimado de 0,2755 (Tabela 8). Já a população MEX foi a que menos divergiu das populações testadas, apresentando valores significativos de pares de F_{ST} apenas para as populações de COB, MOC e PAL (Tabela 8).

Tabela 8. Tabela de matriz de pares de F_{ST} (Weir & Hill, 2002) entre populações (metade inferior) e número absoluto de migrantes ($M=2Nm$) entre populações (metade superior) estimado com base em F_{ST} . Os códigos das populações estão identificados na Tabela 7.

	CAL	MEX	PAN	COB	VIC	ELD	PAL	PLA	CON	MOC	IND
CAL		-	4,6294	1,4473	2,3144	2,2804	1,9640	2,7764	2,0865	1,3152	2,1657
MEX	-0,0272		-	3,8634	-	45,2659	11,9075	-	-	4,8168	-
PAN	0,0975*	-0,0183		2,6752	8,9735	9,1188	26,5215	10,7949	26,9117	2,0483	9,9921
COB	0,2568*	0,1146*	0,1575*		2,4033	2,7507	2,6060	2,9998	2,6084	2,8621	2,5407
VIC	0,1777*	-0,0048	0,0528*	0,1722*		20,6094	30,0714	18,5766	9,1396	3,3147	39,7833
ELD	0,1798*	0,0109	0,0520*	0,1538*	0,0237		11,2886	244,2262	10,6316	4,1413	16,4957
PAL	0,2029*	0,0403*	0,0185	0,1610*	0,0164	0,0424*		21,3427	14,7175	2,6643	14,5313
PLA	0,1526*	-0,0149	0,0443*	0,1429*	0,0262	0,0020	0,0229		8,4738	3,5951	13,5597
CON	0,1933*	-0,0099	0,0182	0,1609*	0,0519*	0,0449*	0,0329*	0,0557*		2,3515	-
MOC	0,2755*	0,0940*	0,1962*	0,1487*	0,1311*	0,1077*	0,1580*	0,1221*	0,1753*		4,7757
IND	0,1876*	-0,0252	0,0477*	0,1644*	0,0124	0,0294*	0,0333*	0,0356*	-0,0036	0,0948*	

Legenda: (*) Significativo ($p < 0,05$); (-) Estimativas não calculadas (infinito).

A árvore de *Neighbor-Joining* gerada com base na distância genética de Nei et al. (1983) apresentou valores de *bootstrap* >75 apenas em dois ramos. O primeiro foi aquele que agrupa as populações de CAL e MEX com valor de *bootstrap* 94 e o segundo para as populações de MOC e COB com valor de *bootstrap* 77. Todos os outros ramos revelaram valores de *bootstrap* inferiores a 50 (Figura 4).

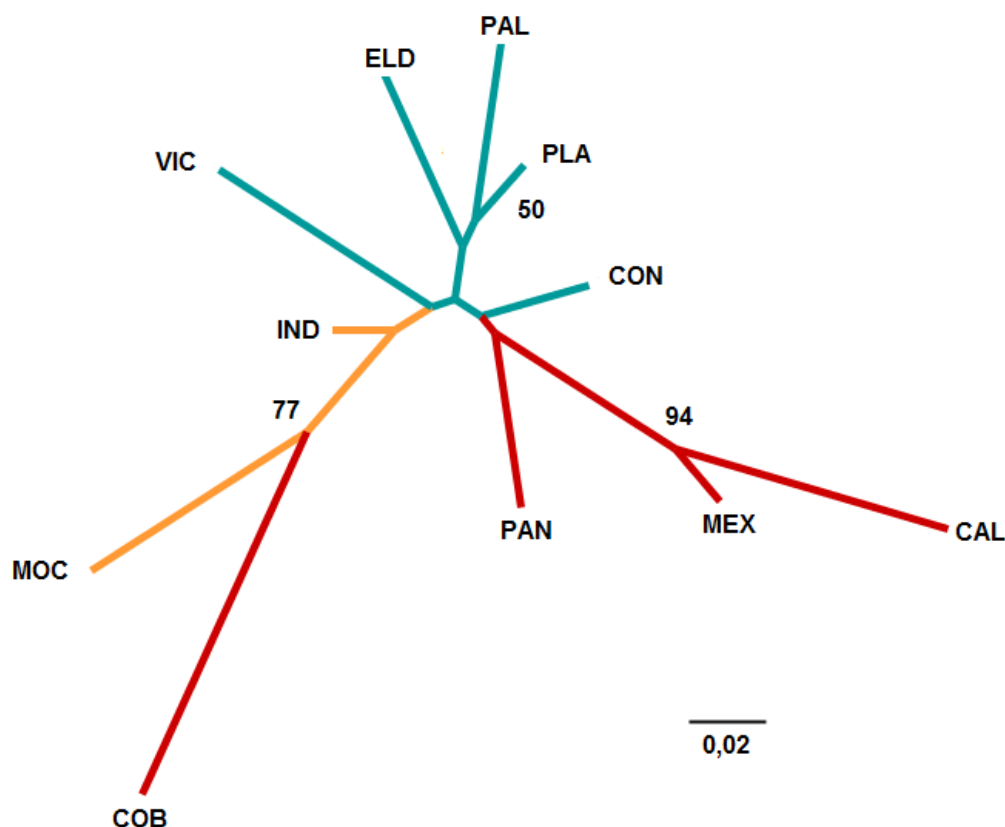


Figura 4. Árvore não enraizada de *Neighbor-Joining* gerada com base na distância genética D_A (Nei et al., 1983). Em azul, populações do grupo do Brasil, em vermelho, populações do grupo ODM (Origem e diversidade do milho) e, em laranja claro, as populações de Mapula, Moçambique (MOC) e a população Shimla, Índia (IND). São mostrados os valores de *bootstrap* maiores que 50.

A estrutura genética entre os locais estudados foi determinada utilizando o programa STRUCTURE v 2.2 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2007). A convergência entre as análises foi realizada seguindo o modelo de *Admixture*, obtida por $[\text{Pr}(X|K)]$ (Pritchard et al., 2000) gerou um $K=6$ (média de $\ln[\text{Pr}(X|K)] = -3255,36 \pm 82,03$), enquanto o método sugerido por Evanno et al. (2005) através de ΔK convergiu para $K=3$ (média de $\ln[\text{Pr}(X|K)] = -3647,42 \pm 23,79$) (Figura 5). Estes resultados reafirmam a baixa divergência genética entre os grupos e alta diversidade dentro dos grupos.

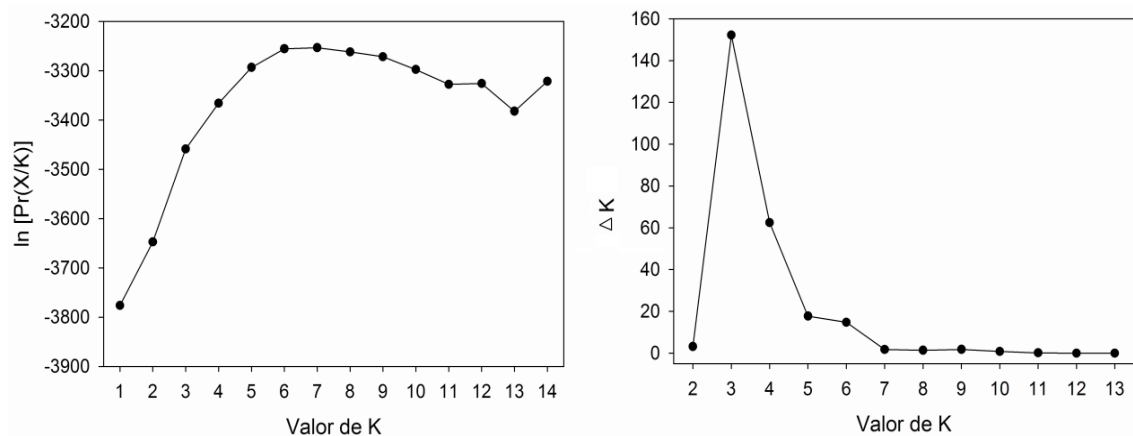


Figura 5. Agrupamentos populacionais identificados pelo programa Structure com base em sete loci de microssatélites: (A) $\ln[\text{Pr}(X|K)]$ e (B) ΔK (ΔK com K 2 a 14 com 1.000.000 simulações).

Considerando $K = 3$, os indivíduos se agruparam de acordo com sua origem geográfica, com exceção os indivíduos provenientes da população de COB que se agruparam com os indivíduos de MOC e IND (Figura 6). Os indivíduos provenientes do grupo do Brasil apresentam características próprias, no entanto, parece existir igual contribuição na variabilidade genética das populações do Brasil dos indivíduos provenientes do grupo ODM (principalmente, MEX e PAN) e das populações de MOC e IND. Já a população de CAL foi aquela que mais divergiu das populações brasileiras.

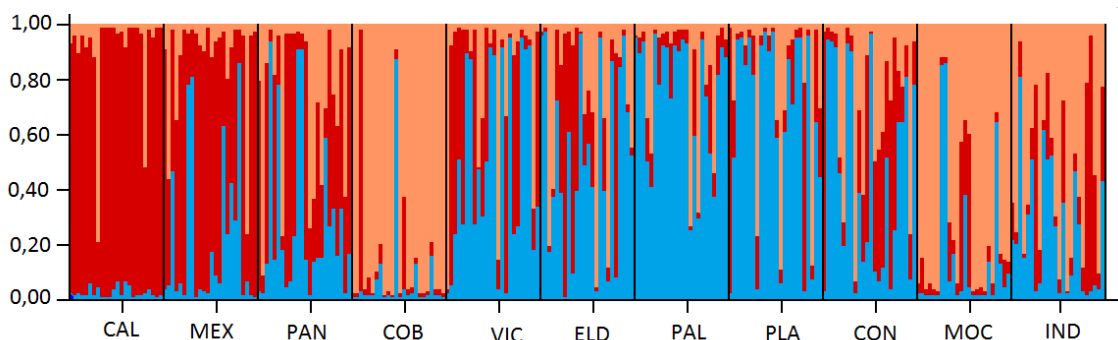


Figura 6. Gráfico obtido do aplicativo STRUCTURE conduzida para indivíduos de *S. zeamais*, com $K = 3$. Cada grupo (K) com suas similaridades alélicas representadas por uma cor, cada indivíduo é representado por uma barra vertical.

4. DISCUSSÃO

4.1. Marcadores mitocondriais de *S. zeamais* e *S. oryzae*

Os valores moderados de diversidade haplotípica (Hd) e baixos de diversidade nucleotídica para os indivíduos de *S. zeamais* caracteriza um modelo de rápida expansão geográfica (Grant & Bowen, 1998), resultado confirmado pela distribuição de *mismatch* que apresentaram valores de p não significativo para ambos os índices r e SSD, o que não rejeita o modelo de expansão espacial dos indivíduos de *S. zeamais*. O formato de “estrela” da rede de haplótipos também é forte indício da recente expansão geográfica da espécie. A recente expansão geográfica dos indivíduos de *S. zeamais* pode estar diretamente ligada ao aumento das áreas plantadas de cereais no mundo (Monfreda et al., 2008). Especificamente na América do Sul, o aumento de plantios de cereais em regiões centrais do continente ocorreu a partir de da década de 1980, com a introdução de novas variedades principalmente de trigo, arroz e milho tolerantes a temperaturas mais altas e a solos mais ácidos. Nossos resultados para os marcadores mitocondriais encontraram diversidade mitocondrial similar entre os indivíduos de *S. zeamais* e outros representantes da família Curculionidae considerados pragas (Kim & Sappington, 2004; Anducho-Reyes et al., 2008).

A diversidade haplotípica dentro dos grupos de *S. zeamais* apontou valores marginalmente maiores para os grupos do Brasil e da Ásia em relação aos outros grupos, principalmente da América do Norte. Este padrão de maior diversidade do grupo da Ásia é esperado devido a Ásia ser o local de origem do gênero *Sitophilus* (Plarre, 2010) e vários estudos envolvendo dispersão de espécies, incluindo insetos, apontam maior diversidade genética em áreas de origem em relação às áreas de colonização mais recente (Cox, 2004; Puillandre et al., 2008; Valade et al., 2009). No entanto, isso não foi demonstrado com tanta clareza para *S. zeamais*, onde a diversidade haplotípica é similar entre o grupo da Ásia e do Brasil e o déficit de variabilidade em outras regiões não é acentuado. Além disso, o índice de fixação $\Phi_{SC} = 0,042$, que aponta a variabilidade dentro dos locais de coleta, foi menor quando testado o grupo do Brasil em relação ao geral, demonstrando que o Brasil é o componente mais importante da variabilidade populacional dentro dos grupos amostrados. Duas hipóteses são aceitas para explicar a diversidade similar das espécies invasoras nos locais de origem e em locais recém-colonizados (Cox, 2004). A primeira é um número elevado de insetos migrantes das áreas de origem para as áreas de colonização. A segunda seriam eventos diversos e contínuos de introdução como discutido anteriormente. A segunda hipótese é suportada pela AMOVA, visto que, a mesma indicou que a maior parte da variabilidade genética está dentro das populações e não entre populações, tanto para dois níveis hierárquicos ($\Phi_{ST} = 0,209$), quanto para três níveis hierárquicos ($\Phi_{ST} < 0,249$), onde foi testado cada grupo isoladamente em relação ao geral. Especificamente no grupo do Brasil, a diversidade similar de *S. zeamais* em relação ao grupo da Ásia pode ser explicada pela melhor adaptação de *S. zeamais* a climas mais quentes e úmidos e, em segundo plano, a preferência de hospedeiro, já que o milho é o principal cereal cultivado no território brasileiro em área plantada e volume de grão produzido (Corrêa et al., 2013).

O haplótipo H1 foi extremamente frequente nos indivíduos amostrados de caruncho-do-milho e amplamente distribuído em todas as

regiões de coleta no mundo, podendo sugerir o mesmo como haplótipo ancestral dos indivíduos amostrados. No entanto os haplótipos localizados nas porções mais exteriores da rede não apresentam estrutura genética que permita inferências mais profundas sobre a distribuição histórica do caruncho-do-milho no Brasil e no mundo. A impossibilidade de inferir as rotas de dispersão histórica do caruncho-do-milho, através da análise de rede de haplótipos, pode estar relacionada a eventos múltiplos e constantes de colonização destes insetos nas regiões produtoras de grãos no planeta. Especificamente para *S. zeamais*, este é um contexto amplamente aceitável, visto que o transporte de grãos entre regiões produtoras é extremamente comum, até mesmo em escalas globais. Além disso, a biologia reprodutiva deste inseto favorece sua dispersão em massas de grãos, já que as fêmeas colocam seus ovos dentro dos grãos e as fases jovens passam todo o seu ciclo no interior dos grãos, utilizando o mesmo com alimento e abrigo (Hagstrum et al., 1996; Rees, 1996). Também existem constantes relatos de insetos adultos, que possuem grande longevidade, alimentando-se e desenvolvendo-se em vários hospedeiros alternativos como frutas e legumes (Delobel & Grenier, 1993), o que pode favorecer sua dispersão e manutenção em áreas de colonização recente.

Outra peculiaridade, das espécies-praga do gênero *Sitophilus*, que pode ter resultado na impossibilidade de inferir a distribuição histórica através de marcadores do mtDNA é a presença de simbiontes celulares (Heddi et al., 1999; 2001). Estes, assim como as mitocôndrias, são herdados por origem materna e podem indiretamente resultar em seleção positiva do material mitocondrial levando a uma falta de concordância entre os padrões históricos de dispersão das espécies e os marcadores mitocondriais (Hurst & Jiggins, 2005; Ballard & Melvin, 2010). Este efeito não foi percebido nos testes de neutralidade realizados (D de Tajima e F_s de Fu). No entanto, este contexto deve ser melhor explorado em estudos futuros e não pode ser descartado, pois essa relação parasítica/simbiótica parece ainda ser bastante recente dentro do gênero *Sitophilus* (Heddi et al., 2001; Cornord et al., 2008; Plarre, 2010).

4.2. Marcadores nucleares de *S. zeamais*

A diversidade alélica encontrada nos indivíduos de *S. zeamais* foi similar a aquelas encontradas em outros coleópteros-praga (Sallé et al., 2003; Kim & Sappington, 2004; Kim & Sappington, 2005; Guzman et al., 2010). Não houve grande diferença do número de alelos por locus entre 11 locais avaliados e entre os grupos previamente definidos. No entanto, a heterozigosidade esperada foi, em 10 locais de coleta, maior que a heterozigosidade observada revelando um excesso de homozigotos nos indivíduos estudados, o que foi também apontado pelo coeficiente de endogamia (F_{IS}). Esse resultado pode ser explicado por características reprodutivas da espécie como comportamento gregário (o macho possui feromônio de agregação) e forte sobreposição de geração, visto que o ciclo de ovo a adulto é de 30 dias e o adulto se mantém apto para reprodução por até seis meses (Evans, 1981; Rees, 1996).

Os resultados da AMOVA, como para os marcadores mitocôndrias, revelaram que a parte da diversidade total está dentro das populações ($\Phi_{ST} = 0,134$), tanto quando avaliamos os 11 locais de coleta simultaneamente, ou quando divididos em grupos, não sendo evidenciada estrutura genética entre as populações estudadas. Este resultado também foi confirmado pela árvore de distancia genética de Nei et al., (1983) que apresentou valores de *bootstrap* aceitáveis (>75) apenas para os ramos que agrupam os indivíduos da Califórnia (CAL) e México (MEX) (94) e os indivíduos de Colômbia (COB) e Moçambique (MOC) (77). Já os índices de fixação (G_{ST} e F_{ST}) apontaram diferença genética entre os 11 locais amostrados e quando divididos em grupos baixa diferença genética moderada, o que sugere grande fluxo gênico entre as populações amostradas principalmente entre os locais de coleta mais próximos geograficamente, como estimado pela diferença genética (F_{ST}) e número absoluto de migrantes ($M=2Nm$) de cada local de coleta par a par (ver tabela 10). O fluxo gênico entre os locais de coleta pode estar relacionada com o transporte de grãos e de seus subprodutos infestados entre as regiões amostradas e com a recente expansão dos

plantios de cereais no mundo, principalmente o milho, principal hospedeiro do caruncho-do-milho, que começou a ser cultivado em escala global na década 1950 (Monfreda et al., 2008).

Nossos resultados da estrutura populacional do caruncho-do-milho mostram padrões semelhantes aos encontrados para outro importante Curculionidae-praga, o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*). Esta praga também possui maior parte da variabilidade dentro das populações e alto nível de migrantes entre os locais de coleta, que se correlacionam significativamente com a distância geográfica (Kim & Sappington, 2006). Desta forma, como no caruncho-do-milho, as populações do bicudo-do-algodoeiro não estão em equilíbrio e sua atual estruturação genética reflete uma série de recentes eventos de expansão devido aos níveis atuais de fluxo gênico encontrado entre as populações estudadas (Slatkin, 1993).

A análise de grupos no Structure apontou um $K = 3$, o que confirma a pequena diferença genética entre os locais amostrados. No entanto, aponta uma estruturação geográfica entre os indivíduos estudados, onde os indivíduos podem ser organizados geneticamente mantendo um padrão de acordo com os grupos anteriormente definidos. Isso significa que os indivíduos oriundos do Brasil são mais parecidos geneticamente entre eles, assim como os indivíduos da Califórnia (CAL), México (MEX) e Panamá (PAN) e os indivíduos provenientes de Moçambique (MOC) e Índia (IND). No entanto, os indivíduos coletados na Colômbia (COB) são uma exceção, pois é formada por indivíduos geneticamente mais similares aos indivíduos da Índia (IND) e principalmente Moçambique (MOC) do que os indivíduos oriundos do continente americano, o que sugere uma recente migração entre estes locais de coleta, visto que os marcadores de microssatélites são eficientes em demonstrar fluxo gênico recente entre os locais estudados (Guichoux et al., 2011). Este cenário reflete com clareza a dispersão aleatória e a grandes distâncias de indivíduos de *S. zeamais* no planeta, o que sustenta a hipótese de grande interferência antrópica na atual estrutura genética das populações de caruncho-do-milho (Buckland, 1981).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados demonstraram que a atual estrutura populacional do caruncho-do-milho é provavelmente oriunda de eventos múltiplos e contínuos de dispersão e que a maior parte da variabilidade genética está dentro das populações estudadas não sendo possível traçar rotas históricas para dispersão dessa espécie para o Brasil e outras regiões produtoras de cereais no planeta. Estas afirmações são apropriadas pelas características de expansão do tamanho populacional e geográfico indicadas pelas análises geradas a partir de dados do mtDNA e também pelos índices de fixação da AMOVA tanto para o mtDNA quanto para os marcadores de microssatélites que apontaram que a maior parte da variabilidade genética está dentro das populações e não entre populações. Os marcadores de microssatélites, também, indicaram baixa diferenciação genética e altos níveis de migrantes entre os locais de coleta, o que demonstra o constante fluxo genético entre as áreas de plantios e estocagem de grãos. Este fluxo genético é maior em áreas mais próximas geograficamente, com indicado pela análise do Structure e pela tabela com os valores de F_{ST} e o número de migrantes que indicaram que indivíduos mais próximos geograficamente compartilham maior quantidade do material genético. No entanto, fluxo gênico pode ocorrer em regiões distantes até mesmo entre diferentes continentes, possivelmente pelo transporte de grãos infestados por fases imaturas do inseto, principal hipótese para justificar a extrema similaridade genética entre as populações da Colômbia (COB) e Moçambique (MOC). As características aqui relatadas das populações de caruncho-do-milho são amplo interesse para os programas de manejo integrado desta espécie, visto que a variabilidade dentro das populações é alta e o fluxo genético entre regiões produtoras é constante o que pode levar o ganho de características comportamentais, ecológicas e fisiológicas que resultem em sérias falhas no combate desta espécie-praga em unidades armazenadoras. Especificamente, para programas de manejo da resistência a inseticidas estas informações são bastante preocupantes, visto que a migração de

alelos que conferem aumento da sobrevivência a inseticidas entre as regiões produtoras é o pior cenário possível.

AGRADECIMENTOS

A todos os pesquisadores e colegas pelo empenho em coletar e enviar as populações de insetos utilizadas no presente trabalho. À Dra A.P. Souza e os integrantes do Laboratório de Análise Genética e Molecular (LAGM) da UNICAMP pelo suporte técnico para a construção da biblioteca genômica enriquecida para a confecção dos marcadores de microssatélites. Nós também agradecemos a Dra E. Caixeta e aos outros membros do Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (EMBRAPA, Brasil) pelo suporte no uso do sequenciador. As instituições FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão de bolsas e financiamento de projetos que permitiram a realização do trabalho.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adda, C.; Borgemeister, C.; Meikle, W.G.; Markhaam, R.H.; Poehling, H. M. Integrated pest management in post-harvest maize: a case study from the Republic of Togo (West Africa). *Agriculture, Ecosystems & Environment* 93, 305-321, 2002.
- 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* 14, 1015-1024, 2005.
- Anducho-Reyes MA, Cognato AI, Hayes JL, Zúñiga G. Phylogeography of the bark beetle *Dendroctonus mexicanus* Hopkins (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49, 930–940, 2008.
- Avise J.C. *Phylogeography: The history and formation of the species*. Harvard Univ. Press, Cambridge. 2000.

- Ballard, J.W.O.; Melvin, R.G. Linking the mitochondrial genotype to the organismal phenotype. *Molecular Ecology* 19, 1523–1539, 2010.
- Bandelt, H.J.; Forster, P.; Rohlf, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16, 37–48, 1999.
- Brown, S.L.; Lee, R.D. Effect of planting data, variety and degree of ear maturation on the colonization of field corn by maize weevils (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Entomological Science* 37, 137-142, 2002.
- Buckland, P.C. The early dispersal of insect pests of stored products as indicated by archaeological records. *Journal of Stored Products Research* 17, 1–12, 1981.
- 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* 10, 303-314, 2001.
- Clement, M.; Posada, D. and Crandall, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9, 1657-1659, 2000.
- Conord, C.; Despres, L.; Vallier A.; Balmand, S.; Miquel, C.; Zundel, S.; Lemperiere, G.; Heddi, A. Long-term evolutionary stability of bacterial endosymbiosis in the Curculionidea: additional evidence of symbiont replacement in the Dryophthoridae family. *Molecular Biology and Evolution* 25, 859–868, 2008.
- Conord, C.; Despres, L.; Vallier, A.; Balmand, S.; Miquel, C.; Zundel, S.; Lemperiere, G.; Heddi, A. Long-term evolutionary stability of bacterial endosymbiosis in the Curculionidea: additional evidence of symbiont replacement in the Dryophthoridae family. *Molecular Biology and Evolution* 25, 859–868, 2008.
- Corrêa, A.S.; Oliveira, L.O.; Braga, L.S.; Guedes, R.N.C. Distribution of the related weevil species *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* in Brazil. *Insect Science in press*, 2013.

- Corrêa, A.S.; Vinson, C.C.; Guedes, R.N.C.; Oliveira, L.O. Characterization and transferability of microsatellite markers in three weevil pest species of the genus *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae). *Molecular Ecology Resources* *aceito*, 2012.
- Cox, G.W. *Alien Species and Evolution*, Island Press, Washington, DC. 2004.
- Crandall, K.A.; Templeton, A.R. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 134, 959–969, 1993.
- Danho, M.; Gaspar, C.; Haubruge, E. The impact of grain quality on the biology of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): oviposition, distribution of eggs, adult emergence, body weight and sex ratio. *Journal of Stored Products Research* 38, 259-266, 2002.
- Delobel, B.; Grenier, A.M. Effect of non-cereal food on cereal weevils and tamarind pod weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 29, 7-14, 2003.
- Dickau, R.; Ranere, A.J.; Cooke, R.G. Starch grain evidence for the preceramic dispersals of maize and root crops into tropical dry and humid forests of Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104, 3651–3656, 2007
- Emerson, B.C.; Oromí, P; Hewitt, G.M. Mtdna phylogeography and recent intra-island diversification of Canary Island *Calathus* beetles (Carabidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13, 149–158, 1999.
- Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14, 2611–2620, 2005.
- Evans, D.E. The biology of stored products Coleoptera. In: *Proc. Aust. Dev. Asst. Course on Preservation of Stored Cereals*. p.145-185, 1981.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479–491, 1992.

- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. ARLEQUIN version 3.01: an integrated software package for population genetics data analysis. Bern: University of Bern, Zoological Institute. 2006.
- Fu Y.X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915-925, 1997.
- Goudet, J. FSTAT: a computer program to calculate F-statistics (Version 2.9.3.2.). *Journal of Heredity*, Edinburg 86, 485-486, 2002.
- Grant, W.S., Bowen, B.W., Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insight from sardines and anchovies and lesson for conservation. *Journal of Hereditary* 89, 415–426, 1998.
- Grapputo, A.; Boman, S.; Lindström, L.; Lyytinen, A.; Mappes, J. The voyage of an invasive species across continents: genetic diversity of North American and European Colorado potato beetle populations. *Molecular Ecology* 14, 4207-4219, 2005.
- Guedes, N.P.G.; Guedes, R.N.C.; Campbell, J.F.; Throne, J.E. Contest behaviour of maize weevil larvae when competing within seeds. *Animal Behaviour* 79, 281–289, 2010.
- Guedes, R.N.C.; Oliveira, E.E.; Guedes, N.M.P.; Ribeiro, B.M.; Serrão, J.E. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiological Entomology* 31, 30-38, 2006.
- Guichoux, E.; Lagache, L.; Wagner, S.; Chaumeil, P.; Léger, P.; Lepais, O.; Lepoittevin, C.; Malausa, T.; Revardel, E.; Salin, F.; Petit, R.J. Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11, 591–611, 2011.
- Guzmán, N.; Contreras-Díaz, H.; Lanteri, A.; Juan, Confalonieri, C.V. Isolation and characterization of microsatellite loci in the fruit tree weevil *Naupactus xanthographus* (Coleoptera: Curculionidae): cross-amplification in related species of the *Naupactus–Pantomorus* complex. *Journal of Genetics* 89, 23-27, 2010.
- Hagstrum, D. W.; Flinn, P.W. (Eds.) Integrated management of insects in stored products. New York: Marcel Dekker, p. 71-134, 1996.

- Heddi, A.; Grenier, A.M.; Khatchadourian, C.; Nardon, C.; Charles, H.; Nardon, P. Four intracellular genomes direct weevil biology: nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and *Wolbachia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96, 6814–6819, 1999.
- Heddi, A.; Charles, H.; Khatchadourian, C. Intracellular bacterial symbiosis in the genus *Sitophilus*: the "Biological Individual" concept revisited. *Research in Microbiology* 152, 431-437, 2001.
- Hidayat, P.; Phillips, T.W.; French-constant, R.H. Molecular and morphological characters discriminate *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and confirm reproductive isolation. *Annals of the Entomological Society of America* 89, 645–652, 1996.
- Hurst, G.D.D.; Jiggins, F.M. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of Biological Sciences* 272, 1525–1534, 2005.
- Kim, K.S.; Sappington, T.W. Boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) (Coleoptera: Curculionidae) dispersal in the southern United States: evidence from mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology and Evolution* 33, 457-470, 2004.
- Kim, K.S.; Sappington, T.W. Polymorphic microsatellite loci from the western corn rootworm (Insecta: Coleoptera: Chrysomelidae) and cross-amplification with other *Diabrotica* spp. *Molecular Ecology Notes* 5, 115–117, 2005.
- 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* 127, 143–161, 2006.
- LANGELLA O. Populations, 1.2.30. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.org/~tryphon/populations/>> 1999.
- Lewis, P.; Zaykin, D. Genetic Data Analysis: Computer Program for the Analysis of Allelic Data . Version 1.0. (d16c). Free Program Distributed by

the Authors over the Internet from <http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php>. 2001.

Librado, P.; Rozas, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452, 2009.

Monfreda, C.; Ramankutty, N.; Foley, J.A. Farming the planet: 2. Geographic distribution of crop areas, yields, physiological types, and net primary production in the year 2000. *global Biogeochemical Cycles*, 22, doi:10.1029/2007GB002947, 2008.

Nei, M. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 70, 3321-3323, 1973.

Nei, M.; Tajima, F.; Tateno, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data II. Gene frequency data. *Journal of Molecular Evolution* 19, 153–170, 1983.

Piperno, D.R.; Ranere, A.J.; Holst, I.; Iriarte, J.; Dickau, R. Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106, 5019-1024, 2009.

Plarre, R. An attempt to reconstruct the natural and cultural history of the granary weevil, *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). *European Journal Entomology* 107, 1–11, 2010.

Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P. Reference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959, 2000.

Puillandre N, Dupas S, Dangles O.; Zeddani, J.L.; Capdevielle-Dulac, C.; Barbin, K.; Torres-Leguizamón, M.; Silvain, J.F. Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. *Biological Invasions* 10, 319–333, 2008.

Obata, H.; Manabe, A.; Nakamura, N.; Onishi, T.; Senba, Y. A New Light on the Evolution and Propagation of Prehistoric Grain Pests: The World's Oldest Maize Weevils Found in Jomon Potteries, Japan. *Plos One* 6, e14785, 2011.

- Ray, N.; Currat, M.; Excoffier, L. Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Molecular Biology and Evolution* 20, 76-86, 2003.
- Rees, D.P. Coleoptera. In Subramanyam, B.H. & D.W. Hagstrum. Integrated management of insects in stored products. New York: Marcel Dekker, p. 1-39, 1996.
- Rogers, A.R.; Harpending, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9, 552-569, 1992.
- Rozen, S.; Skaletsky, H.J. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386, 2000
- Sallé, A.; Kerdelhué, C.; Breton, M.; Lieutier, F. Characterization of microsatellite loci in the spruce bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytinae). *Molecular Ecology Notes* 3, 336–337, 2003.
- Schrey, N.M.; Schrey, A.W.; Heist, E.J.; Reeve, J.D. Genetic Heterogeneity in a Cyclical Forest Pest, the Southern Pine Beetle, *Dendroctonus frontalis*, is Differentiated Into East and West Groups in the Southeastern United States. *Journal of Insect Science* 11, 110, 2011.
- Slatkin, M. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47, 264–279, 1993.
- Slatkin, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139, 457–462, 1995.
- Tajima, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585–595, 1989.
- Templeton, A.R.; Crandall, K.A.; Sing, C.F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132, 619–633, 1992.
- Valade R.; Kenis, M.; Hernandez-Lopez, A.; Augustin, S.; Mari, N. M.; Magnoux, E.; Rougerie, R.; Lakatos, F.; Roques, A.; Lopez-Vaamonde,

- C. Mitochondrial and microsatellite DNA markers reveal a Balkan origin for the highly invasive horse-chestnut leaf miner *Cameraria ohridella* (Lepidoptera, Gracillariidae). *Molecular Ecology* 18, 3458–3470, 2009.
- Van Oosterhout, C.; Hutchinson, W.F.; Wills, D.P.M.; Shipley, P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4, 535-538, 2004.
- Weir, B.S.; Cockerham, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358-1370, 1984.
- Weir, B.S.; Hill, W.G. Estimating F-statistics. *Annual Review of Genetics* 36, 721-750, 2002.
- Whitlock, M.C.; Mccauley, D.E. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \approx 1/(4Nm + 1)$. *Heredity* 82, 117-125, 1999.
- Wright, S. The genetical structure of populations. *Annual Eugenics* 15, 223-354, 1951.

Capítulo 4: Linhagens mitocondriais, lise mitocondrial e taxa respiratória são associadas com susceptibilidade a fosfina em populações brasileiras de caruncho-do-milho, *Sitophilus zeamais*?

Alberto S. Corrêa¹, Luiz Orlando de Oliveira², Hudson V. Ventura Tomé¹, Lucas S. Braga¹, Raul Narciso C. Guedes¹

¹Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, Brazil

²Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, Brazil

(submeter a Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology)

RESUMO

Fosfina é atualmente o fumigante mais empregado no controle de pragas em unidades armazenadoras, principalmente após a proibição do brometo de metila, o que também agravou os problemas de resistência a este composto entre os insetos de produtos armazenados como caruncho-do-milho, *Sitophilus zeamais*, principal praga de cereais no Brasil. Apesar da importância da fosfina como fumigante, o seu mecanismo de toxicidade e de resistência ainda são poucos esclarecidos, no entanto a mitocôndria é amplamente reconhecida como o principal sítio de ação da fosfina. Aqui nós exploramos a susceptibilidade de populações caruncho-do-milho a fosfina e sua associação com a taxa respiratória e com linhagens mitocondriais definidas a partir do sequenciamento de fragmentos dos genes citocromo c oxidase subunidade I (COI) e citocromo c oxidase subunidade II (COII). Também se avaliou a ação da fosfina na degradação das mitocôndrias de células musculares do inseto. Sobrevivência à fosfina variou entre as populações estudadas, que foi negativamente correlacionada com a taxa respiratória e a massa corpórea dos insetos. A exposição dos insetos a fosfina não provocou completa lise mitocondrial, no entanto a população mais resistente à fosfina exibe maior densidade mitocondrial. Redução da taxa respiratória minimiza a ação da fosfina e está associada à ocorrência de maior densidade mitocondrial em células musculares. Nós não detectamos associação entre as linhagens mitocondriais e a

susceptibilidade fosfina, o que indica evolução independente entre estes dois fatores, e impossibilidade da utilização dos genes mitocondriais COI e COII como marcadores moleculares de sobrevivência a fosfina.

Palavras-chave: Genótipos mitocôndrias, Resistência à Fosfina, Marcadores Mitocondriais, Insetos de Grãos Armazenados.

1. INTRODUÇÃO

Fosfina é o principal fumigante em uso no mundo para proteção de grãos armazenados e de outras commodities (Chaudry, 2000; Benhalima et al., 2004). Este status é devido a eliminação progressiva do brometo de metila, além de características como amplo espectro de ação, rápida difusão, baixo custo e mínima ação residual (Chaudry, 2000; Wang et al., 2006). No entanto, a alta frequência de aplicação da fosfina, aliada as inadequadas condições herméticas de armazenamento, tem aumentado drasticamente os problemas de resistência à fosfina em pragas de produtos armazenados, desde o levantamento global da FAO em 1976 (Champ & Dyte, 1976; Chaudry, 2000; Collins et al., 2003; Pimentel et al., 2007, 2009). Curiosamente, apesar da importância da fosfina como fumigante e a sua utilização em larga escala, os mecanismos de toxicidade e resistência à fosfina permanecem obscuros (Campbell, 2010; Nath et al., 2011).

A mitocôndria é o principal sítio de ação da fosfina cuja toxicidade envolve inibição da respiração aeróbica, ação que pode ser sinergizada por desacopladores da cadeia transportadora de elétrons (Valmas *et al.*, 2008; Zuryn *et al.*, 2008). Estudos *in vitro* com mitocôndrias revelaram que o citocromo c oxidase (complexo IV) localizado na cadeia transportadora de elétrons é fortemente inibida pela fosfina (Chefurka et al., 1976; Nakakita, 1976). Fosfina também pode interferir em reações químicas que envolvem o oxigênio (O₂) resultando na formação de peróxidos e aumento de radicais livres, o que provoca sérios danos oxidativos à célula (Quistad et al., 2000).

Vários estudos genéticos têm apontado que os altos níveis de resistência a fosfina é controlado por mais de um gene (Li et al., 1994; Collins et al., 2002; Schlipalius et al., 2008). Duas regiões gênicas

nucleares, denominadas *Rph1* e *Rph2*, foram identificadas como responsáveis pela expressão da resistência a fosfina em *Rhyzopertha dominica* e análises preliminares indicam que pelo menos um destes *loci* está diretamente ligado à mitocôndria (Kaur, 2012). Genótipos mitocondriais também têm sido relacionados à eficiência bioenergética de um organismo (Ballard & Melvin, 2010), tolerância a outros compostos tóxicos (Sturmbauer *et al.*, 1999; Schizas *et al.*, 2001) e infecção por simbioses bacterianas (Heddi *et al.*, 1999; Hurst & Jiggins, 2005), gerando, quando vantajosa, um aumento da frequência da linhagem mitocondrial associada e consequente perda da diversidade genética (Hurst & Jiggins, 2005; Ballard & Melvin, 2010).

O gênero *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae) enquadra três das principais pragas de produtos armazenados no mundo (Rees, 1996). Particularmente no Brasil destaca-se *Sitophilus zeamais* Motschulsky 1885 (Coleoptera: Curculionidae) (Corrêa *et al.*, 2013) e um aumento alarmante da resistência a fosfina foi reportado nesta espécie nos últimos anos (Pimentel *et al.*, 2009) e tem sido negligenciado nos estudos de toxicidade e resistência. Com isso nosso objetivo inicial foi testar em diversas populações brasileiras de *S. zeamais*, a possível correlação negativa entre sobrevivência a fosfina e taxa respiratória. Posteriormente investigar a ação da fosfina na degradação das mitocôndrias, especificamente em células musculares do tórax de insetos provenientes de populações com diferentes taxas de sobrevivência a fosfina. Também correlacionamos sobrevivência a fosfina com as diferentes linhagens mitocondriais das populações estudadas. Reconhecimento de resistência à fosfina no caruncho-do-milho era esperada, como foi sua associação com a taxa respiratória com base em estudos anteriores com coleópteros de produtos armazenados (Pimentel *et al.*, 2007, 2009, 2012). A toxicidade a fosfina associada a lise mitocondrial também era esperada com base nos resultados obtidos com o nematoide, *Caenorhabditis elegans*. No entanto, a associação das linhagens mitocondriais com resistência à fosfina será depende de uma associação significativa da história evolutiva de ambos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Populações de *Sitophilus zeamais*

Foram utilizadas 16 populações de *S. zeamais* provenientes de armazéns de grãos de diferentes cidades brasileiras em sua maioria coletadas entre os anos de 2008 e 2011 (Fig. 1). As populações foram multiplicadas a partir de um número mínimo de 200 insetos adultos contidos nas amostras de campo e são mantidas em três réplicas em potes de vidro (1,5L) contendo milho isento de inseticidas em condições controladas de temperatura ($27 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa ($70 \pm 10\%$) e fotoperíodo (LD 12:12).

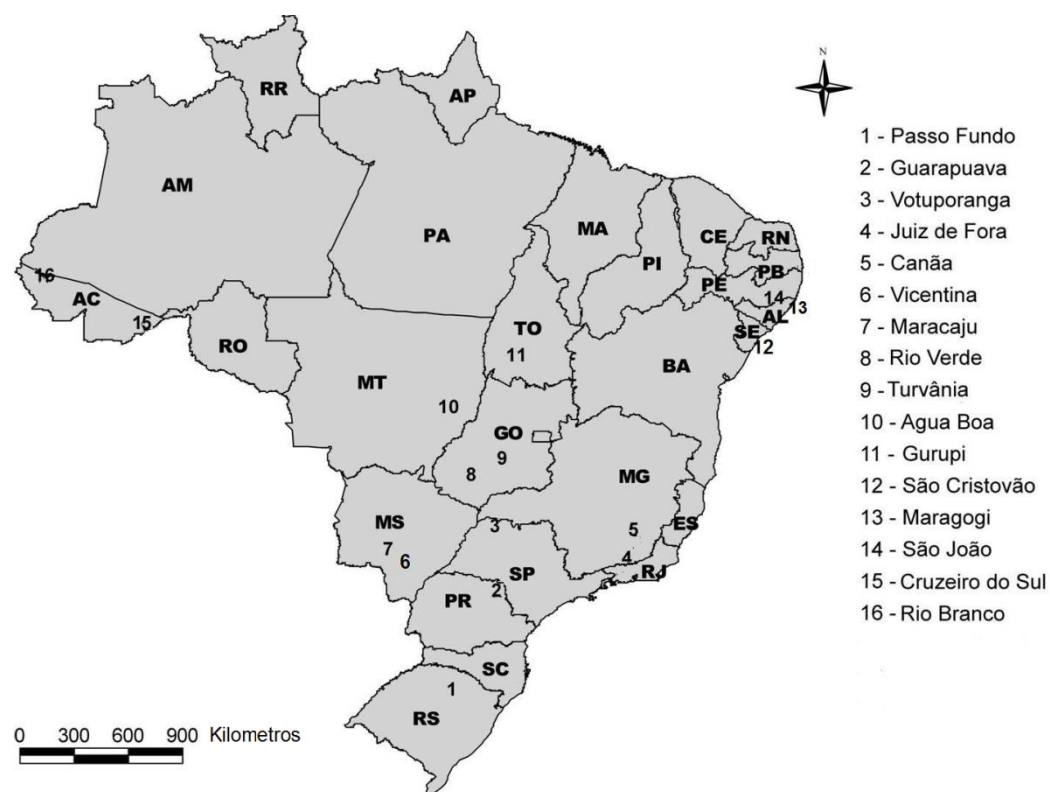


Figura 1. Locais de coleta das 16 populações de caruncho-do-milho, *Sitophilus zeamais*.

2.2. Bioensaios de susceptibilidade a fosfina

Ensaio de sobrevivência a fosfina com indivíduos de *S. zeamais* foram realizados de acordo com metodologia da FAO (FAO, 1975) com

devidas adaptações (Pimentel et al., 2009). Inicialmente, a fosfina (ac 86% pureza) foi produzida a partir de uma pastilha de 0,6 g de fosfato de alumínio (Casa Bernardo, São Paulo, Brasil) emergida em uma solução de 5% de ácido sulfúrico. Posteriormente, um total de 100 insetos adultos não sexados com idade de 1 a 15 dias de cada população foram acondicionados em dessecadores devidamente vedados no delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições de 25 insetos para cada população. Através de uma seringa a fosfina foi injetada no dessecador até atingir a concentração discriminatória de 0,04 mg/L. Os insetos foram expostos por um período de 20h e posteriormente alocados em potes com grãos de milho isento de inseticida por mais 14 dias para posterior avaliação da mortalidade (FAO, 1975). Os insetos eram considerados mortos quando não apresentavam nenhum movimento após um pequeno estímulo realizado com uma pinça.

2.3. Taxa respiratória e Massa Corpórea

O ensaio de respirometria foi realizado utilizando um respirômetro do tipo TR3C equipado com um analisador de CO₂ (Sable System International, Las Vegas, NV, EUA) e metodologia adaptada de Guedes et al. (2006) e Corrêa et al. (2011a). Foram separados quatro grupos de 10 insetos adultos devidamente acondicionados numa câmara com capacidade de 25 mL. Este número de insetos foi escolhido devido a sensibilidade do aparelho proporcionando assim melhor simetria na captura dos dados. Esta câmara foi conectada a um sistema completamente fechado, onde o CO₂ produzido pelos insetos (μ L de CO₂ / hora) é varrido por um fluxo de ar isento de CO₂ e mensurado por um leitor infravermelho de CO₂ conectado ao sistema. Posteriormente a massa corpórea destes insetos foi mensurada utilizando balança analítica (Sartorius BP 210D, Göttingen, Germany). Os valores de taxa respiratória não foram normalizados pela massa corporal porque este procedimento mascara o efeito individual de cada inseto (Packard & Boardman, 1999; Haynes, 2001). Portanto, os resultados da taxa respiratória e da massa corporal dos insetos foram apresentados de maneira isolada.

2.4. Microscopia de confocal de mitocôndrias

Insetos não sexados com idade de 1 a 3 dias de três populações com diferentes níveis de tolerância a fosfina foram expostos de maneira contínua a concentração de 0.04 mg/L do fumigante por períodos de 20 e 72 horas. Posteriormente os insetos foram dissecados em solução fisiológica tamponada (NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄) para extração das fibras musculares da região do tórax do inseto. Após essa etapa, os tecidos foram transferidos para lâminas de vidro onde foram expostos a 100 µL do corante específico para mitocôndrias (100 nM; MitoTracker® Green FM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Esse corante tem potencial de coloração *in vivo*, sendo específico para marcação de mitocôndrias. Após adição do corante as lâminas foram incubadas em ambiente completamente ausente de luz por 1 hora a 37°C. Foram realizadas três réplicas para cada tempo (0, 20 e 72 h) e para cada população. As imagens foram capturadas em microscópio confocal de escaneamento a laser Zeiss LSM 510 META com objetiva de 63x. Os comprimentos de onda de excitação e emissão do fluorocromo foram de 490 e 510 nm, respectivamente.

2.5. Estabelecimento das linhagens mitocondriais

As linhagens mitocôndrias foram estabelecidas através do sequenciamento de fragmentos dos genes citocromo c oxidase subunidade I (COI) e citocromo c oxidase subunidade II (COII), visto que o complexo citocromo c oxidase da cadeia transportadora de elétrons é o principal sítio de ação da fosfina na mitocôndria (Valmas *et al.*, 2008; Nath *et al.*, 2011). Os primers utilizados para amplificação do fragmento de gene COI foram COISz-F (5' - GGGCTGAATTAGGGAATCCT - 3') e COISz-R (5' - CTCCTGTTAATCCCCGATA - 3') (Corrêa *et al.*, 2013). Já os primers para região do COII (COIISz-F 5' - TGCTTCAAGATAGAGCCTCTCC - 3'; COIISz-R 5' - GGTTTGCTCCACAGATTTTCAG - 3') foram construídos com base na sequência depositada no NCBI (AY014881) utilizando o aplicativo *Primer 3*. Posteriormente realizamos a extração do DNA total de 5-7 indivíduos de cada população, seguindo a metodologia de Corrêa *et al.*, (2013). A amplificação via PCR foi realizada em volume total de 25 µL,

contendo 3 µL de DNA (40ng), 12,1 µL de água ultra pura, 5 µL de tampão IVB (5X) (Phoneutria), 0,7 µl de dNTP (2,5mM), 2 µl de cada primer (R e F) e 0,2 µL de Taq (Phoneutria). Os ciclos de PCR para os dois conjuntos de primers foram iniciados com uma desnaturação de 5 min a 94 °C seguidos por 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 45 s e 72 °C por 1,5 min e uma extensão final a 72 °C por 10 min. Posteriormente 5 µl do produto da PCR foi aplicado em gel de agarose (1.0 %) e visualizado sob luz ultravioleta e suas imagens digitalizadas em um sistema de captura de imagens (Eagle Eye, Stratagene, La Jolla, CA, USA). Posteriormente o processo de purificação foi realizado com enzima *ExoSap* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) na proporção de 1,5 uL para cada de 10 uL de produto de PCR e o sequenciamento das amostras foi terceirizado pela MACROGEN INC., (Seul, Coreia do Sul).

2.6. Análises Estatísticas

Os dados de sobrevivência a fosfina foram corrigidos de acordo com Abbott (1925) e posteriormente submetidos à análise de variância (ANOVA) e o teste de agrupamento de Scott-Knott ($p < 0,05$) (SAEG, 2000). Este teste de agrupamento teve como objetivo dividir as populações em grupos de acordo com a sobrevivência. Os dados de sobrevivência também foram submetidos à análise de regressão linear e correlação de Pearson com a taxa respiratória e massa corpórea ($p < 0,05$) (SigmaPlot 12.0). Os dados de sequenciamento foram alinhados e editados manualmente no aplicativo Sequencher 4.0.1 (Gene Codes Corp., Ann Harbor, MI, USA). Posteriormente, as sequencias foram analisadas com os aplicativos DNAsp v.5 (Librado & Rozas, 2009), para estimativa do número de haplótipos (H) e diversidade de haplótipos (Hd), e com o aplicativo NETWORK 4.5.0.2 (Fluxus Technology, Sudbury, UK) para a confecção da rede de haplótipos.

3. RESULTADOS

3.1. Susceptibilidade a fosfina, taxa respiratória e massa corpórea

Os resultados para sobrevivência a fosfina apresentaram diferença significativa entre as populações estudadas ($F_{(15; 48)} = 7,73$; $p < 0,001$). As

populações foram separadas em quatro grupos de acordo com a sobrevivência a fosfina pelo teste de Scott-knott ($p < 0,05$) (Fig. 2A). A sobrevivência variou de 0% para as populações provenientes de Guarapuava e São João a 42% de sobrevivência para a população de Vicentina (Fig. 2A). A taxa respiratória dos insetos foi um dos principais fatores para a sobrevivência à fosfina, resultando em uma associação significativa e negativa, onde a maior taxa respiratória conduziu a baixa sobrevivência à fosfina ($F_{(1; 62)} = 22,79$, $P < 0,001$, $R^2 = 0,27$; Fig. 2B) com médias variando de 1,30 ($\pm 0,14$) μL de CO_2 /hora/inseto para Vicentina a 2,38 ($\pm 0,94$) μL de CO_2 /hora/inseto para Gurupi. A massa corpórea também foi associada com a sobrevivência a fosfina ($F_{(1; 62)} = 8,25$, $P = 0,006$, $R^2 = 0,12$; Fig. 2C) com menor média para população de Água Boa, 1,91 ($\pm 0,11$) mg/inseto, e maior média para população de São João, 2,11 ($\pm 0,38$) mg/inseto. Já os parâmetros taxa respiratória e massa corpórea não apresentaram correlação nas populações estudadas ($R = 0,23$; $p = 0,07$).

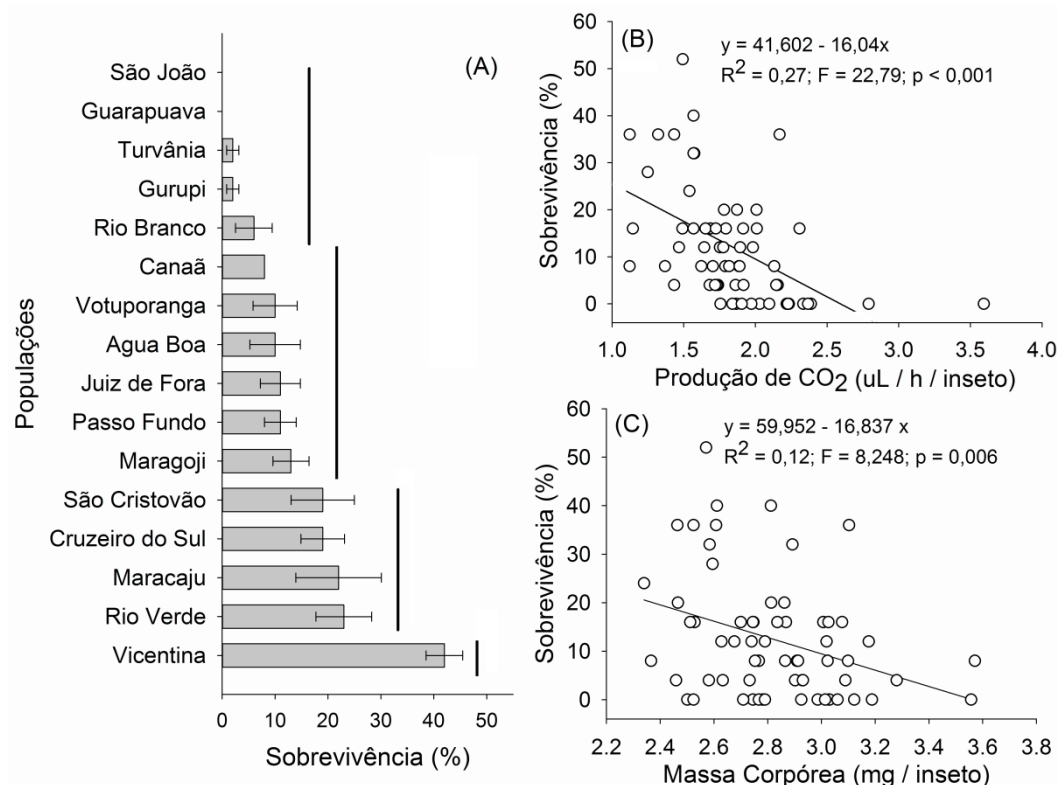


Figura 2. Taxa de sobrevivência (média \pm EP) de 16 populações de caruncho-do-milho (A); Sobrevivência (%) em relação a taxa respiratória (B) e a massa corporal (C) de indivíduos de caruncho-do-milho *Sitophilus zeamais*.

3.2. Microscopia de confocal com mitocôndrias

Foi observado um efeito marginal da exposição a fosfina nas mitocôndrias das células musculares nas diferentes populações estudadas e para os diferentes tempos de exposição, 0, 20 e 72 horas (Fig. 3A-L). Nos bioensaios de toxicidade envolvendo exposição à fosfina, as populações de caruncho-do-milho apresentaram aparentemente uma menor intensidade de mitocôndrias nas células musculares quando expostos a fosfina por 20 e 72 horas (Fig. 3A-F, 3G-L). E de maneira geral a população de alta sobrevivência a fosfina (Vicentina) apresentou uma maior intensidade de mitocôndrias em relação às populações de baixa e moderada sobrevivência a fosfina (São João e Passo Fundo, respectivamente) (Fig. 3A/C/E).

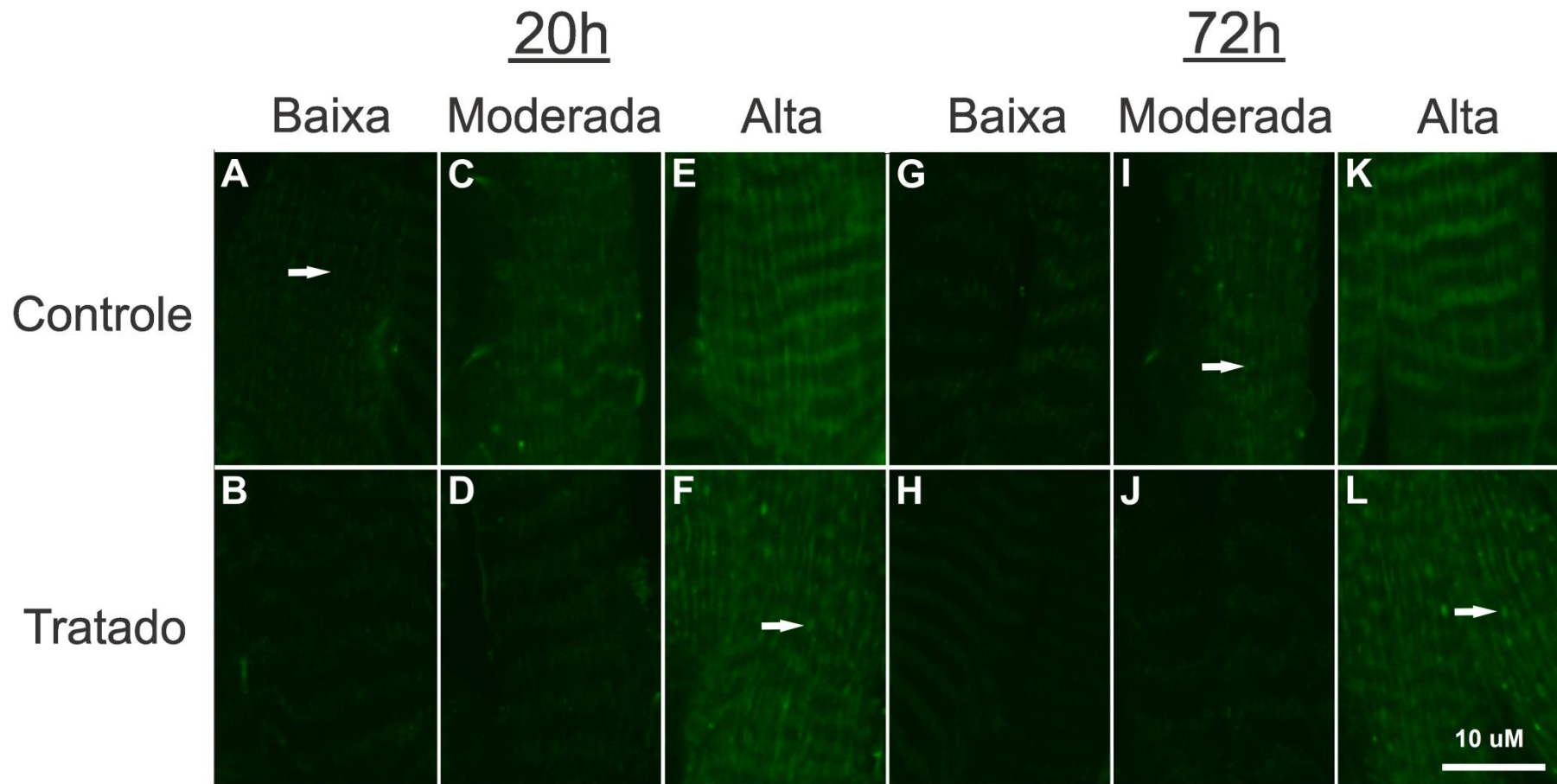


Figura 3. Microscopia de confocal das mitocôndrias de fibras musculares de indivíduos de três populações de *S. zeamais* com 0, 20 e 72 horas de exposição a fosfina. As setas indicam uma única mitocôndria.

3.3. Linhagens mitocondriais

Após o sequenciamento e concatenação dos fragmentos dos genes COI (806 pb) e COII (507) obtemos sete haplótipos mitocondriais gerando uma diversidade haplotípica de 0,73 nas 16 populações de *S. zeamais* estudadas (Fig. 4A). A rede de haplótipos apresentou os haplótipos 1, 3 e 4 como haplótipos centrais e os haplótipos 2, 5, 6 e 7 foram haplótipos pontas (Fig. 4B). Os haplótipos 1, 3 e 4 foram os mais frequentes e estão amplamente distribuídos em todo o território brasileiro. Já o haplótipo 2 foi encontrado nas populações de Canaã-MG, Turvânia-GO, Vicentina-MS e Votuporanga-SP e os haplótipos 5, 6 e 7 foram restritos a população proveniente de Maragogi-AL. No entanto, observando a rede de haplótipos e a distribuição destes dentro das populações com diferentes níveis de sobrevivência a fosfina, não houve relação entre os haplótipos mitocondriais e a sobrevivência a fosfina nas populações brasileiras de caruncho-do-milho estudadas (Fig. 4B).

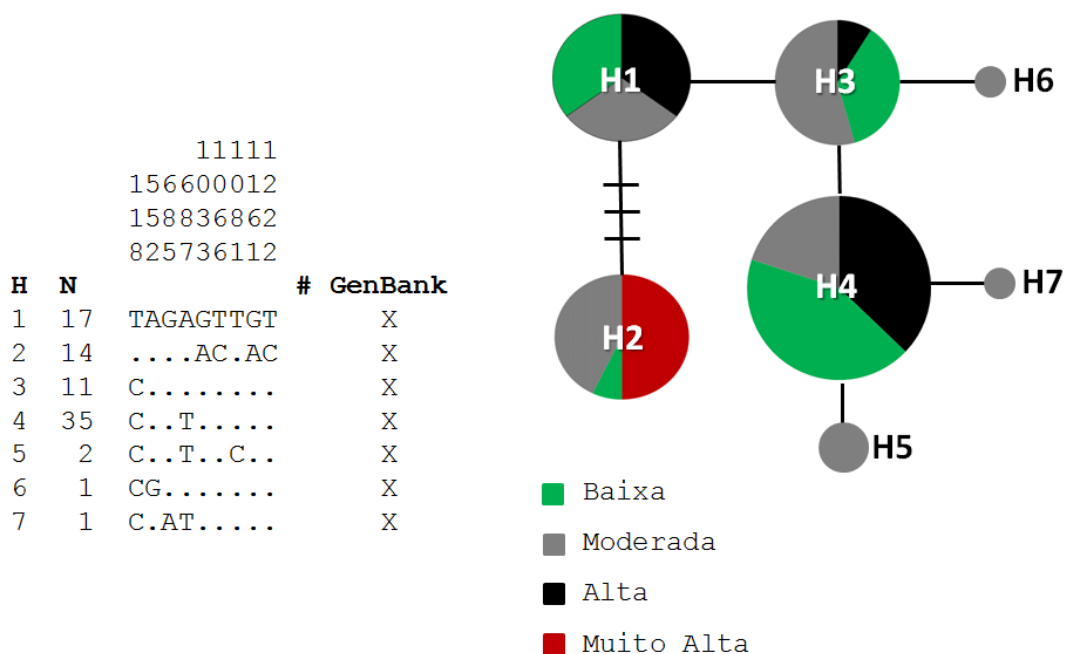


Figura 4. Rede de haplótipos da concatenação dos genes COI e COII de *S. zeamais* gerada pelo aplicativo computacional NETWORK 4.5.0.2. H: haplótipos; N: número de indivíduos amostrados com o respectivo haplótipo. Cada linha representa um evento de mutação e os traços haplótipos não amostrados ou extintos.

4. DISCUSSÃO

Aqui nós exploramos a susceptibilidade de populações de caruncho-do-milho a fosfina e sua associação com a taxa respiratória dos insetos. Também foi testado se lise das mitocôndrias em células musculares quando expostas a fosfina e se as linhagens mitocondriais das populações estudadas estão envolvidas com a susceptibilidade a fosfina. Com base em estudos anteriores, resistência a fosfina no caruncho-do-milho era esperada, assim com sua associação com a taxa respiratória (Pimentel et al., 2007, 2009, 2012). Na verdade susceptibilidade a fosfina variou entre as populações de caruncho-do-milho refletindo seus diferentes níveis de resistência a este fumigante, uma preocupação inicialmente expressada pela FAO (1976) e que vem se tornando cada vez mais grave no mundo. Resistência à fosfina só recentemente foi relatado em populações brasileiras do caruncho-do-milho (Pimentel et al., 2009) e nos confirmamos o problema que se estendeu a quase 70% das populações de insetos testados.

A associação entre a resistência à fosfina e a taxa de respiração já tinha sido reconhecida por Price (1981, 1984), sugerindo que a diminuição da absorção de fosfina é um mecanismo subjacente de resistência a este fumigante. A relação entre a resistência à fosfina e a taxa respiratória foi finalmente confirmada em diferentes espécies de pragas de produtos armazenados (Pimentel et al., 2007, 2012), que também se estende para o caruncho-do-milho como aqui relatado. Absorção de fosfina pelo inseto através da taxa respiratória parece, portanto, um importante fator da toxicidade a fosfina em insetos de grãos armazenados.

Nós esperávamos que a fosfina agisse diretamente na degradação das mitocôndrias como foi relatado para o nematoide *C. elegans* quando expostos a fosfina (Zuryn et al., 2008). Este é provavelmente o resultado do mecanismo de toxicidade da fosfina nas mitocôndrias que resulta em rápida interrupção da cadeia transportadora de elétrons e consequente perda da função metabólica da organela provocando insuficiência energética e morte do organismo (Valmas et al., 2008; Nath et al., 2011). Desta forma, a lise das mitocôndrias causada pela exposição fosfina também era esperado no

caruncho-do-milho, que poderia variar entre populações, dependendo do seu grau de susceptibilidade à fosfina. No entanto, não observamos lise mitocondrial completa em células musculares do caruncho-do-milho, mas uma diferença apenas marginal na degradação mitocôndrias sob a exposição de fosfina para 20 e 72 h. Curiosamente, a população de caruncho-do-milho mais resistente à fosfina apresentou maior densidade de mitocôndrias nas suas fibras musculares, condições que pode favorecer este fenótipo quando exposto a fosfina. Aumento no número de cópias do material genômico mitocondrial foi observada por Zuryn et al. (2008) em indivíduos resistentes a fosfina de *C. elegans*, o que suporta a hipótese de que alta densidade mitocondrial prejudica a eficácia da fosfina no organismo alvo.

O principal sítio de ação da fosfina na mitocôndria é o citocromo c oxidase (Chefurka et al., 1976;. Nakakita, 1976;. Nath et al., 2011). Esta foi uma das razões pelas quais nós utilizados fragmentos do gene citocromo c oxidase (COI e COII) para testar a possível associação entre resistência a fosfina e as linhagens mitocondriais das populações de caruncho estudadas. Outro motivo foi a alta variabilidade associada nestes fragmentos de genes mitocondriais, que são frequentemente utilizados em estudos populacionais (Hebert et al., 2003;. Smith et al., 2007; Stewart et al., 2010; Emery et al., 2011; Hrcek et al., 2011;. Sufran & Puterka, 2011; Blacket et al., 2012; Corrêa et al., 2013). No entanto, apesar de haplótipos mitocondriais apresentarem comprovada eficiência como marcadores de resistência a compostos tóxicos, como cádmio em *Tubifex tubifex* (Oligochaeta: Tubificidae) e inseticidas (organofosforados e DDT) em *Microarthridion littorale* (Harpacticoida: Tachidiidae) (Sturmbauer et al., 1999;. Schizas et al., 2001), o mesmo não aconteceu para o caruncho-do-milho. Haplótipos mitocondriais e resistência a fosfina não estão relacionados no caruncho-do-milho, assim como os haplótipos mitocondriais e resistência ao inseticida diflubenzuron em populações europeias da traça-das-maçãs, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) (Meraner et al., 2008.). Desta forma, a resistência a fosfina e os haplótipos mitocôndrias evoluíram de maneira

independentemente no caruncho-do-milho, apesar da alegada associação do mecanismo de ação da fosfina e o citocromo c oxidase (Cherfurka et al., 1976; Nakakita, 1976).

A baixa diversidade e falta de estrutura espacial dos haplótipos nas populações de caruncho-do-milho indicam que esta espécie exibe expansão recente e aleatória no Brasil. Esta é também provável razão por que não fomos capazes de identificar um marcador adequado associado com resistência à fosfina em populações de caruncho-do-milho no Brasil. Assim como em outros trabalhos que também cultivaram insucessos em investigar a estrutura espacial das populações de caruncho-do-milho com a resistência a inseticidas no território brasileiro (Ribeiro et al., 2003; Pereira et al., 2009).

Em resumo, a resistência a fosfina variou entre as populações brasileiras de caruncho-do-milho e foi negativamente afetada pela taxa respiratória e a massa corporal. Exposição a fosfina não levou a completa lise mitocondrial em indivíduos de carunchos, no entanto resistência a este fumigante foi associada com ocorrência de maior densidade mitocondrial nas fibras musculares destes insetos. Não foi possível detectar qualquer associação entre linhagens mitocondriais e susceptibilidade a fosfina, que parecem evoluir de maneira independente, e os fragmentos do gene mitocondrial de citocromo c oxidase, especificamente subunidade I e II, não foram úteis como marcadores moleculares de resistência à fosfina.

AGRADECIMENTOS

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV pela colaboração nas etapas que compreenderam a visualização das mitocondriais na microscopia de confocal. Assim como as instituições de fomento FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) pela concessão de bolsas e financiamento de projetos que permitiram a realização do trabalho.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18, 265-267, 1925.
- Ballard, J.W.O.; Melvin, R.G. Linking the mitochondrial genotype to the organismal phenotype. *Molecular Ecology* 19, 1523-1539, 2010.
- Benhalima, H.; Chaudhry, M.Q.; Mills, K.A.; Price, N.R. Phosphine resistance in stored-product insects collected from various grain storage facilities in Morocco. *Journal of Stored Products Research* 40, 241–249. 2004.
- Campbell, P.M. Comparison of the mitochondrial proteomes of phosphine-susceptible and -resistant *Tribolium castaneum*. *Journal of Stored Products Research* 46, 197-201, 2010.
- Champ, B.R.; Dyte, C.E., FAO Global Survey of Pesticide Susceptibility of Stored Grain Pests. FAO/UN, Rome. 1976.
- Chaudhry, M.Q. Phosphine resistance: a growing threat to an ideal fumigant. *Pesticide Outlook* 11, 88-91, 2000.
- Chefurka, W.; Kashi, K.P.; Bond, E.J. The effect of phosphine on electron transport in mitochondria. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 6, 65–84, 1976.
- Collins, P.J.; Daghli, G.J.; Bengston, M.; Lambkin, T.M.; Pavic, H. Genetics of resistance to phosphine in *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera : Bostrichidae). *Journal of Economic Entomology* 95, 862–869, 2002.
- Collins, P.J.; Emery, R.N.; Wallbank, B.E. Two decades of monitoring and managing phosphine resistance in Australia. In: Credland, P.F., Armitage, D.M., Bell, C.H., Cogan, P.M., Highley, E. (Eds.), *Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored-Product Protection*. CAB International, Oxford, UK, pp. 570–575. 2003.
- Corrêa, A.S.; Pereira, E.J.G.; Cordeiro, E.M.G.; Braga, L.S.; Guedes, R.N.C. Insecticide resistance, mixture potentiation and fitness in populations of the maize weevil (*Sitophilus zeamais*). *Crop Protection* 30, 1655-1666, 2011.

- Corrêa, A.S.; Braga, L.S.; Oliveira, L.O.; Guedes, R.N.C. Distribution of the related weevil species *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* in Brazil. *Insect Science* (in press), 2013
- FAO. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. 16: Tentative method for adults of some stored cereals, with methyl bromide and phosphine. *FAO Plant Protection Bulletin* 23, 12–25, 1975.
- Fragoso, D.B.; Guedes, R.N.C.; Rezende, S.T. Biochemical mechanisms of insecticide resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 109, 21–29. 2003.
- Guedes, R.N.C.; Oliveira, E.E.; Guedes, N.M.P.; Ribeiro, B.; Serrão, J.E. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiological Entomology* 31, 145-150, 2006.
- Haynes, J.P. Mass-specific and whole-animal metabolism are not the same concept. *Physiological and Biochemical Zoology* 74, 147–150, 2001.
- Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L.; DeWaard, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B* 270, 313-321, 2003.
- Heddi, A.; Grenier, A.M.; Khatchadourian, C.; Nardon, C.; Charles, H.; Nardon, P. Four intracellular genomes direct weevil biology: nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and *Wolbachia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96, 6814–6819, 1999.
- Hrcek, J., Miller, S.E., Quicke, D.L.J., Smith, M.A., 2011. Molecular detection of trophic links in a complex insect host–parasitoid food web. *Mol. Ecol. Res.* 11, 786–794.
- Hurst, G.D.D.; Jiggins, F.M. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B* 272, 1525–1534, 2005.

- Kaur, R. Molecular genetics and ecology of phosphine resistance in Lesser Grain Borer, *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae). PhD Thesis, The University of Queensland, Brisbane, Australia, 2012.
- Li, Y.S., Li, W.Z., Li, W.W., Wu, X.Q. Genetic analysis of phosphine resistance in *Rhyzopertha dominica* and *Sitophilus oryzae*. *Acta Entomologica Sinica* 37, 271-279, 1994.
- Librado, P.; Rozas, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452, 2009.
- Meraner, A.; Brandstätter, A.; Thaler, R.; Aray, B.; Unterlechner, M.; Niederstätter, H.; Parson, W.; Zelger, R.; Dalla Via, J.; Dallinger, R. Molecular phylogeny and population structure of the codling moth (*Cydia pomonella*) in Central Europe: I. Ancient clade splitting revealed by mitochondrial haplotype markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48, 825–837, 2008.
- Nakakita, H. The inhibitory site of phosphine. *Journal of Pesticide Science* 1, 235–238, 1976
- Nakakita, H. The mode of action of phosphine. *Journal of Pesticide Science* 12, 299–309, 1987
- Nath, N.S.; Bhattacharya, I.; Tuck, A.G.; Schlipalius, D.I.; Ebert, P.R. Mechanisms of Phosphine Toxicity. *Journal of Toxicology* 494168 (doi:10.1155/2011/494168) 2011.
- Packard, G.C., Boardman, T.J., The use of percentages and size-specific indices to normalize physiological data for variation in body size: wasted time, wasted effort? *Comparative Biochemistry and Physiology C* 122, 37–44, 1999.
- Pereira, C.J.; Pereira, E.J.G.; Cordeiro, E.M.G.; Della Lucia, T.M.C.; Tótola, M.R.; Guedes, R.N.C. Organophosphate resistance in the maize weevil *Sitophilus zeamais*: magnitude, costs and behavior. *Crop Protection* 28, 168-173, 2009.

- Pimentel, M.A.G.; Faroni, L.R.D.A.; Totola, M.R.; Guedes, R.N.C. Phosphine resistance, respiration rate and fitness consequences in stored-product research. *Pest Management Science* 63, 876–881, 2007.
- Pimentel, M.A.G.; Faroni, L.R.D.A.; Guedes, R.N.C.; Sousa, A.H.; Tótola, M.R. Phosphine resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 45, 71–74, 2009.
- Pimentel, M.A.G.; Faroni, L.R.; Silva, F.H.; Batista, M.D.; Guedes, R.N.C. Spread of phosphine resistance among Brazilian populations of three species of stored product insects. *Neotropical Entomology* 39, 1-7, 2010.
- Pimentel, M.A.G.; Faroni, L.R.; Corrêa, A.S.; Guedes, R.N.C. Phosphine-induced walking response of the lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica*). *Pest Management Science* (in press) (doi: 10.1002/ps.3314), 2012
- Price, N.R. A comparison of the uptake and metabolism of ³²P radiolabelled phosphine in susceptible and resistant strains of the lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica*). *Comparative Biochemistry and Physiology C* 69, 129–131, 1981
- Price, N.R. Active exclusion of phosphine as a mechanism of resistance in *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Stored Products Research* 20,163–168, 1984.
- Quistad, G.B.; Sparks, S.E.; Casida, J.E. Chemical model for phosphine-induced lipid peroxidation. *Pest Management Science* 56, 779–783, 2000.
- Rees, D.P. Coleoptera. In: Subrmayam, Bh., Hagstrum, D.W. (Eds.), *Integrated Management of Insects in Stored Products*, Marcel Dekker, New York, NY, USA, pp. 1-40, 1996
- SAEG. Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil. 2005.
- SAS Institute. SAS/STAT User's Guide. SAS Institute, Cary, NC, USA, 2008.

- Schlupalius, D.I.; Chen, W.; Collins, P.; Nguyen, T.; Reilly, P.; Ebert, P. Gene interactions constrain the course of evolution of phosphine resistance in the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. *Heredity* 100, 506-516, 2008
- Schlupalius, D.I.; Cheng, Q.; Reilly, P.E.B.; Collins, P.J.; Ebert, P.R. Genetic linkage analysis of the lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* identifies two loci that confer high-level resistance to the fumigant phosphine. *Genetics* 161, 773-782, 2002
- Schizas, N.V.; Chandler, G.T.; Coull, B.C.; Klosterhaus, S.L.; Quattro, J.M. Differential survival of three mitochondrial lineages of a marine benthic copepod exposed to a pesticide mixture. *Environmental Science & Technology* 35, 535–538, 2001.
- Scott, A.J.; Knott, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics* 30, 507-512, 1974.
- Shufran, K.A.; Puterka, G.J. DNA barcoding to identify all life stages of holocyclic cereal aphids (Hemiptera: Aphididae) on wheat and other Poaceae. *Annals of the Entomological Society of America* 104, 39-42, 2011.
- Smith, M.A.; Woodley, N.E.; Janzen, D.H.; Hallwachs, W.; Hebert, P.D.N. DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104, 4967-4972, 2007.
- Stewart, L.C.; Hale, R.J.; Hale, M.L. Species-specific primers for the molecular identification of cryptic *Bombus* species in New Zealand. *Conservation Genetics* 11, 1207–1209, 2010.
- Sturmbauer, C.; Opadiya, G.B.; Niederstätter, H.; Riedmann, A.; Dallinger, R. Mitochondrial DNA reveals cryptic oligochaete species differing in cadmium resistance. *Molecular Biology and Evolution* 16, 967–974, 1999.

- UNEP. Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer. 1994 Report of the Methyl Bromide Technical Options Committee. Assessment, UNEP, Nairobi, Kenya. 1995.
- Valmas, N.; Zuryn, S.; Ebert, P.R. Mitochondrial uncouplers act synergistically with the fumigant phosphine to disrupt mitochondrial membrane potential and cause cell death. *Toxicology* 252, 33–39, 2008.
- Wang, D.; Collins, P.J.; Gao, X. Optimising indoor phosphine fumigation of paddy rice bag-stacks under sheeting for control of resistant insects. *Journal of Stored Products Research* 42, 207–217, 2006.
- Zuryn, S.; Kuang, J.; Ebert, P. Mitochondrial modulation of phosphine toxicity and resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology Science* 102, 179–186, 2008.

CONCLUSÃO GERAL

Aqui desenvolvemos um novo método rápido e eficiente de identificação de duas espécies pragas do gênero *Sitophilus*, *S. zeamais* e *S. oryzae*, utilizando primers espécie-específicos na região do gene citocromo c oxidase subunidade I. Com auxílio destes primers confirmamos que *S. zeamais* é a espécie com maior distribuição e ocorrência no território brasileiro, que aliado ao seu grande poder destrutivo, o confirma como uma das principais pragas dos cereais armazenados no Brasil. Estudos populacionais e filogeográficos demonstraram que a atual estrutura populacional do caruncho-do-milho é provavelmente oriunda de eventos múltiplos e contínuos de dispersão e que a maior parte da variabilidade genética está dentro das populações estudadas, não sendo possível traçar rotas históricas para dispersão dessa espécie para o Brasil e outras regiões produtoras de cereais no planeta. Estas afirmações são suportadas pelas características de expansão espacial recente das populações de caruncho-do-milho indicadas pelas análises dos dados de mtDNA e pelo baixo número de alelos e baixa heterozigosidade gerados por marcadores microssatélites. Além disso, ambos marcadores apontaram que a maior parte da diferença genética está dentro das populações e não entre populações. Também existe falta de estrutura genética e espacial entre as populações de caruncho-do-milho quando observamos a relação genética entre os haplótipos mitocondriais e sua dispersão no espaço. Os marcadores de microssatélites indicaram baixa diferenciação genética e altos níveis de indivíduos migrantes entre os locais de coleta, o que demonstra o constante fluxo genético entre as áreas de plantios e estocagem de grãos. Este fluxo genético é maior em áreas mais próximas geograficamente, como indicado pela análise do Structure e pela tabela de valores de F_{ST} e o número de migrantes que indicaram que indivíduos mais próximos geograficamente compartilham maior quantidade do material genético. No entanto, pode ocorrer fluxo gênico em regiões distantes até mesmo entre diferentes continentes, possivelmente pelo transporte de grãos infestados por fases

imaturas do inseto, principal hipótese para justificar a extrema similaridade genética entre as populações da Colômbia e Moçambique encontradas no presente trabalho. As características aqui relatadas das populações de caruncho-do-milho são de amplo interesse para os programas de manejo integrado desta espécie, visto que a variabilidade dentro das populações é alta e o fluxo genético entre regiões produtoras é constante o que implica na possibilidade de transmissão de características comportamentais, ecológicas e fisiológicas que resultem em falhas no controle desta espécie-praga em unidades armazenadoras. Especificamente, para os programas de manejo da resistência a inseticidas estas informações são bastante preocupantes, visto que a potencial migração de alelos que conferem aumento da sobrevivência a inseticidas entre as regiões produtoras é o pior cenário possível. Ampla variação da resistência a fosfina foi encontrada entre as populações brasileiras de caruncho-do-milho e foi negativamente afetada pela taxa respiratória e a massa corporal dos insetos. Exposição a fosfina não levou a completa lise mitocondrial em indivíduos de *S. zeamais*, apesar das mitocôndrias serem o principal sítio de ação deste composto inseticida. No entanto resistência a este fumigante foi associada a ocorrência de maior densidade mitocondrial nas fibras musculares destes insetos. Quando tentamos observar alguma estrutura entre as linhagens mitocondriais e susceptibilidade a fosfina, não foi encontrada qualquer associação. Desta forma podemos dizer que susceptibilidade a fosfina e as linhagens mitocondriais evoluíram de maneira independente, e que fragmentos dos genes mitocondriais citocromo c oxidase subunidade I e subunidade II não são úteis como marcadores moleculares de resistência à fosfina em populações brasileiras de caruncho-do-milho.