

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

JULIANA BUENO RUIZ

**Polimorfismos moleculares da praga da cana-de-açúcar *Migdolus*
sp. (COLEOPTERA; VESPERIDAE)**

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2011**

JULIANA BUENO RUIZ

**Polimorfismos moleculares da praga da cana-de-açúcar *Migdolus sp.*
(COLEOPTERA; VESPERIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do Título de Doutor.

Orientador: Prof^a Dr^a Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki.

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2011**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

R934p Ruiz, Juliana Bueno
Polimorfismos moleculares da praga da cana-de-açúcar
Migdolus sp. (COLEOPTERA; VESPERIDAE) / Juliana Bueno Ruiz. --
Maringá, 2011.
80 f. : il. col., figs., quadro.

Orientador: Profa. Dra. Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki.

Co-orientadora: Prof.a Dr.a nome da orientadora.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, 2011.

1. Polimorfismos genéticos. 2. *Migdolus* - cana-de-açúcar.
3. Isoenzimas. 4. Variabilidade genética. 5. RAPD. 6.
Genética de populações. 7. Esterases. I. Takasusuki, Maria
Claudia Colla Ruvolo, orient. II. Universidade Estadual de
Maringá. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento.
III. Título.

CDD 21.ed. 591.35

Aos meus pais que estiveram presentes em todos os momentos, nas adversidades, alegrias e superações, sendo fundamentais para que tudo fosse enfrentado da forma mais simples, sempre com a presença de um amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar os meus passos em todos os caminhos por onde andei e pelos frutos colhidos durante minha vida.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pela estrutura oferecida para elaboração da pesquisa e pelos excelentes professores que contribuíram para o meu crescimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro, concedido por meio de bolsa de estudo.

Às Usinas Usaciga, de Cidade Gaúcha; Usaçúcar, de Tapejara; Usina Alta Alegre, de Colorado, e à empresa Bratac, por possibilitar a realização dessa pesquisa, fornecendo e ajudando na coleta dos *Migdolus* sp.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela contribuição direta em minha formação profissional, tornando possível a subida de mais este degrau entre muitos que a vida me reserva.

Em especial, à professora doutora Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki, pelo valioso trabalho de orientação, pelos conhecimentos transmitidos, pelo crescimento pessoal e profissional e, sem dúvida, pela amizade.

Às professoras Coorientadoras, Claudete Aparecida Mangolin e Maria de Fátima Pires da Silva Machado, pela dedicação em todas as etapas de elaboração deste estudo.

Aos meus amigos de Laboratório, Maycon, Aline e Juliana pelo carinho e ajuda nos experimentos.

Aos meus pais, Francisco e Shirlei, aos meus irmãos, Gabriel, Henrique, Edson e Patrícia, e a toda minha família, que me motivaram a chegar ao final de mais esta importante etapa de minha vida.

Ao meu esposo, pela dedicação, carinho, amor e motivação para alcançar meus objetivos.

Às minhas grandes amigas, Ana Lúcia, Denise e Liriana, por terem sido mais que amigas, verdadeiras irmãs.

Aos demais amigos que, mesmo não listados aqui, desejo homenagear e agradecer. Foram tantas as contribuições.

BIOGRAFIA

Juliana Bueno Ruiz, filha de Francisco Carlos Ruiz e Shirley Bueno Ruiz, nasceu na cidade de Umuarama, estado do Paraná, no dia 30 de março de 1983.

No ano de 1997, no Colégio Estadual Professor Paulo Alberto Tomazinho, na cidade de Umuarama, estado do Paraná. O Ensino Médio concluiu, no ano de 2000, no Colégio Estadual Professor Paulo Alberto Tomazinho, também em Umuarama, estado do Paraná.

Formou-se em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia, pela Universidade Paranaense (Unipar), em 2004.

Em 2005, iniciou o Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação Genética e Melhoramento, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Apicultura. Obteve o título de Mestre em dezembro de 2006.

Em março de 2007, iniciou Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, também na Universidade Estadual de Maringá.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Aspectos gerais de <i>Migdolus</i> sp.	3
2.2. Desenvolvimento biológico de <i>Migdolus</i> sp.	6
2.3. Manejo e controle	13
2.4. Marcadores moleculares: isoenzimas e RAPD	17
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
CAPÍTULO I - Caracterização bioquímica das esterases e proteínas totais de <i>Migdolus</i> sp. (Coleoptera, Vesperidae)	31
RESUMO.....	31
1. INTRODUÇÃO	33
2. MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1. Material biológico	36
2.2. Eletroforese PAGE e SDS/PAGE	36
2.3. Teste de Inibição.....	38
2.4. Termoestabilidade	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4. CONCLUSÕES	45
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
CAPÍTULO II - Padronização para análise com marcadores RAPD em <i>Migdolus</i> sp.	50
RESUMO.....	50
1. INTRODUÇÃO	52
2. MATERIAL E MÉTODO.....	54
2.1. Coleta das amostras biológicas	54
2.2. Isolamento do DNA.....	54
2.3. Amplificação do DNA utilizando primers para RAPD, separação e visualização dos produtos amplificados	55

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4. CONCLUSÃO	60
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
CAPÍTULO III - Genética de populações de <i>Migdolus</i> sp.....	63
RESUMO.....	63
1. INTRODUÇÃO	65
2. MATERIAL E MÉTODO.....	67
2.1. Coleta das amostras biológicas	67
2.2. Isolamento do DNA	68
2.3. Amplificação do DNA utilizando primers para RAPD, separação e visualização dos produtos de amplificação	69
2.4 Análises dos dados	70
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4. CONCLUSÕES	78
5. CONCLUSÕES GERAIS	79
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

RESUMO

RUIZ, Juliana Bueno, D. Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2011. **Polimorfismos moleculares da praga da cana-de-açúcar *Migdolus sp.* (COLEOPTERA; VESPERIDAE)**. Orientadora: Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki. Professoras conselheiras: Claudete Aparecida Mangolin e Maria de Fátima Pires da Silva Machado.

O *Migdolus* é um besouro da família Vesperidae, cuja fase larval prejudica o sistema radicular da cana-de-açúcar. As perdas provocadas por esse inseto podem variar de algumas toneladas de cana por hectare até, na maioria dos casos, a completa destruição da lavoura, resultando na reforma antecipada mesmo de canaviais de primeiro corte. Além das dificuldades normais de controle de qualquer praga de solo, o desconhecimento de várias fases do ciclo desse coleóptero dificulta ainda mais o seu combate. Assim, os objetivos do presente estudo foram caracterizar bioquimicamente as esterases e proteínas totais, padronizar protocolos de isolamento de DNA total e PCR de *primers* RAPD e verificar a variabilidade genética e estrutura de população de *Migdolus sp.* de quatro populações da região noroeste do Paraná. Os adultos de *Migdolus sp.* foram coletados em Umuarama, Cidade Gaúcha, Colorado e Tapejara. As análises das isoenzimas e proteínas totais foram realizadas por meio de eletroforese PAGE e SDS-PAGE, respectivamente. O marcador RAPD foi realizado de acordo com o protocolo desenvolvido neste estudo. Em extratos de cabeça/tórax de machos foram identificadas sete esterases sendo a EST-5 denominada β -esterase e as demais esterases $\alpha\beta$ -esterases. De acordo com a sensibilidade a inibidores, as esterases foram classificadas como: EST-1 Colinesterase I; EST-2 e EST-5 Carboxilesterases; EST-3, EST-4, EST-6 Acetilesterase e EST-7 arilesterase. Nas análises de termoestabilidade foi possível observar que a EST-7 apresentou maior termoestabilidade e a EST-2 foi a esterase mais sensível. Nos extratos de cabeça/tórax de machos foi observado maior número de peptídeos que nos extratos de fêmeas. A análise da genética de populações, utilizando marcador RAPD, permitiu verificar que há grande polimorfismo. As populações analisadas estão diferenciadas, podendo apresentar uma alta variabilidade genética ancestral. As populações de Cidade Gaúcha e Colorado foram agrupadas, bem como as populações de Umuarama e Tapejara, demonstrando que essas populações não possuem barreiras para o cruzamento entre

reprodutores. Devido à alta variabilidade e pequenos valores na distância genética, esta espécie de besouro está bem adaptada à região, sendo necessário o desenvolvimento de programas de controle dessa praga.

Palavras-chave: isoenzimas, esterases, RAPD, genética de populações.

ABSTRACT

RUIZ, Juliana Bueno, D. Sc. Universidade Estadual de Maringá, February 2011. **Molecular polymorphisms of the plague of cane sugar *Migdolus* sp. (COLEOPTERA; VESPERIDAE)**. Advisor: Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki. Committee members: Claudette Mangolin and Maria de Fátima Pires da Silva Machado.

Migdolus is a beetle of Vesperidae family whose larval stage damages the root system of sugar cane. The losses caused by this insect can vary from a few tons of cane per hectare up to, in most cases, the complete destruction of the crop, resulting in early retirement even sugar cane fields in addition to the first cut. Beyond the normal difficulties of any pest control soil, ignorance of the various phases of the cycle of this beetle species further complicates his match. Thus, this study aimed to biochemical characterization the esterases and total proteins, standardize protocols for isolation of total DNA and PCR primers for RAPD and verify the genetic variability and population structure of *Migdolus* sp. four populations from the northwestern region of Paraná. *Migdolus* sp. adults were collected in Umuarama, Cidade Gaucha, Colorado and Tapejara. Analyses of isozymes and total protein were performed by PAGE electrophoresis and SDS-PAGE, respectively. The RAPD was performed according to the protocol developed in this study. In extracts from head/thorax of males identified seven esterases and EST-5 called β -esterase and other esterases $\alpha\beta$ -esterases. According to the inhibitor sensitivity the esterases were classified as EST-1 cholinesterase I, EST-2 and EST-5 carboxylesterases, EST-3, EST-4, EST-6 acetylerase and EST-7 arylesterase. In the analysis of thermostability was observed that the EST-7 showed higher thermostability and EST-2 was the most sensitive esterase. In extracts of head / thorax of males were a higher number of peptides in extracts of females. The analysis of population genetics using RAPD marker, showed that there is great polymorphism. The populations analyzed are different, and may present a high genetic variability ancestor. The populations of Colorado City and Cidade Gaucha have been grouped as well as the populations of Umuarama and Tapejara, demonstrating that these populations have no barriers to crossing between breeders. Due to the high variability and small genetic distance values in this species of beetle is well-fitting to the region, being necessary the development of programs to control this pest.

Key words: enzymes, esterases, RAPD, population genetics.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A demanda crescente por energias renováveis, a concorrência do álcool como combustível e o consentimento dos usuários pelos veículos movidos a etanol têm impulsionado cada vez mais a produção desse combustível, expandindo assim a cultura da cana-de-açúcar a fim de atender ao crescimento do mercado interno e suprir as exportações (Guimarães et al., 2010; Souza, 2010).

Devido à alta do preço do petróleo, dos combustíveis, a falta de recursos naturais e a degradação do meio ambiente e as suas consequências climáticas, o setor sucroalcooleiro do Brasil vem crescendo cada vez mais, revelando-se como um grande competidor na produção de açúcar e etanol (Kawamura et al., 2010).

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) é uma das culturas mais importantes para o Brasil. A valorização do etanol como alternativa à substituição dos combustíveis fósseis, o fortalecimento do preço do açúcar no mercado, a utilização e a valorização de subprodutos industriais resultantes da produção de açúcar e etanol e a alcoolquímica são fatores que incentivaram uma forte extensão da cultura da cana no Brasil e incentivaram a modernização e a maior eficiência da indústria canavieira (Goes et al., 2008).

Estima-se que a safra 2010/2011 chegará a atingir cerca de 560 milhões de toneladas no centro sul (Jacon, 2010). A produtividade média brasileira de cana-de-açúcar poderia ser maior se o desenvolvimento da cultura não fosse prejudicado por fatores bióticos e abióticos (clima e solo). Dentre os fatores bióticos, a incidência de plantas daninhas e a ocorrência de nematóides contribuem para o declínio acentuado da produção. Em áreas infestadas com nematóides, as perdas podem chegar a mais de 50% (Dinardo-Miranda e Ferraz, 1991).

Com a implantação da agricultura, o homem tem proporcionado alimento abundante para algumas espécies de insetos e, com isso, tem permitido um grande aumento de suas populações. Constitui-se um exemplo claro o *Migdolus fryanus*, um besouro que vivia em pequenas populações, atacando principalmente raízes de cipós e que, com a introdução de culturas extensivas de cana-de-açúcar, propiciou alimento abundante ao inseto, que aumentou sua população e, atualmente, constitui uma séria praga dessa cultura (Gallo et al., 2002).

Embora a constatação de *Migdolus* sp., na cultura da cana, data-se desde 1927 (Bento et al., 1995), dentre o complexo de pragas de solo que ocorre nos canaviais, é a que apresenta menor número de informações sobre a duração do ciclo de vida, dispersão, e época de ocorrência. O comportamento subterrâneo das larvas que podem atingir até 4 a 5 metros de profundidade e o ciclo biológico muito longo traz dificuldades para estudos de biologia e da flutuação. Dessa forma, o que se conhece sobre esse inseto refere-se apenas aos primeiros 60 cm de profundidade no solo (Bento et al., 2004). Concomitantemente, em função da dificuldade de realizar estudos nas camadas mais profundas, presume-se que as informações até agora obtidas sobre o inseto sejam apenas de uma parte da população. Assim, esses aspectos dificultam o emprego de métodos de controle eficientes (Machado et al., 2006a).

Um aspecto importante no controle de pragas é o conhecimento de suas características genotípicas. Este conhecimento pode auxiliar no estabelecimento do perfil genético dos insetos e na identificação de marcadores genéticos que apontem para populações resistentes a inseticidas ou potencialmente transmissoras de doenças.

Assim, o uso de marcadores moleculares será importante para analisar as características de populações desses insetos em diferentes áreas na região noroeste do Paraná. Esses estudos permitirão verificar a variabilidade genética desses insetos, proporcionando dados importantes sobre as relações genéticas entre as populações naturais de diferentes zonas geográficas e resultando em informações úteis para a adequação do manejo.

O objetivo do estudo foi desenvolver a caracterização genética por meio de proteínas e RAPD da praga da cana-de-açúcar *Migdolus* sp. (Coleoptera; Vesperidae) para se entender a estrutura de populações desses insetos no noroeste do Paraná. Mais especificamente, o presente estudo teve como objetivo caracterizar bioquimicamente as esterases; determinar as diferenças de machos e fêmeas por SDS/PAGE; padronizar a técnica de RAPD para amostras de *Migdolus* sp.; detectar os polimorfismos pela técnica de RAPD em *Migdolus* sp.; estimar o grau de parentesco intra e interpopulacionais para ampliar o conhecimento da genética de populações desses insetos; inferir sobre o parentesco e a estrutura de populações.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais de *Migdolus* sp.

Migdolus foi classificado inicialmente na subfamília Anplodermatinae por Guérin-Meneville (1840). Após revisões sistemáticas, Duffy (1953) e Crowson (1955) determinaram que o gênero *Migdolus* pertencia à subfamília de Cerambycidae. Entretanto, Svácha et al. (1997) transferiram esta subfamília para a família Vesperidae. Portanto, conforme Dias (1984), a classificação do gênero *Migdolus* se refere à ordem Coleoptera, família Vesperidae, e compreende 10 espécies, quais sejam: *M. brachypterus* (Lane, 1972); *M. clypeatus* (Dias, 1984); *M. cuyabanus* (Lane, 1937); *M. exul* (Lameere, 1915); *M. fryanus* (Westwood, 1863); *M. bouvieri* (Gounelle, 1899) [Sinonímia]; *M. fonsecai* (Lane, 1972) [Sinonímia]; *M. goyanus* (Dias, 1984). Dentre estas espécies, atualmente, pouco se conhece sobre quais espécies estão relacionadas à cultura da cana-de-açúcar (Machado et al., 2006a).

Esta praga é hoje conhecida popularmente por *Migdolus*, ou seja, pelo próprio gênero. Em algumas regiões canavieiras também recebe o nome de “broca-dos-rizomas”, para diferenciá-la da “broca-da-cana-de-açúcar” *Diatrea saccharalis* (Fabr.) (Bento et al., 2004).

A primeira referência sobre o gênero *Migdolus* data de 1863, ano de sua descrição por Westwood. O besouro parece ter origem na região Centro Sul da América do Sul, e já foi encontrado nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Paraná, Rondônia, Santa Catarina, São Paulo, além da Argentina e do Paraguai (Bento et al., 1992; Bento et al., 1995).

Apesar de associados com maior frequência a solos de textura arenosa, é comum também encontrar *Migdolus* sp. em áreas de solos argilosos (Arrigoni e Terán, 1986; Bento, 1998). Segundo Gallo et al. (2002), *Migdolus fryanus* é um inseto de hábito subterrâneo, vivendo em solos profundos, secos e em regiões de cerrados.

A espécie mais conhecida de *Migdolus* é o coleóptero polífago *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera; Vesperidae), nativo da América do Sul (Terán et al., 1983; Kasten Junior et al., 1985), e ataca diversas culturas de

importância econômica, sendo uma das principais pragas da cultura da cana-de-açúcar, no estado de São Paulo (Machado et al., 2003a).

Acredita-se que plantas nativas dos cerrados sejam os hospedeiros naturais destes insetos e que a sua derrubada, especialmente para o plantio de monoculturas, como o café, eucalipto e, mais recentemente, a cana-de-açúcar, tenha favorecido sua adaptação e o aumento na sua densidade populacional (Nakano et al., 2001). Mesmo apresentando um hábito alimentar polífago, este besouro geralmente completa seu ciclo de vida numa única espécie hospedeira, muitas vezes, conduzidas em sistemas de monocultivo, demonstrando alta capacidade adaptativa (Bento et al., 2004).

Os danos são provocados pelas larvas que, durante sua alimentação, destroem o sistema radicular das plantas em qualquer idade (Wilcken et al., 2005), danificando tanto raízes em maior profundidade, como as mais superficiais, podendo destruí-las totalmente. Geralmente atacam os internódios basais dos colmos, localizados abaixo do nível do solo, podendo também atingir os internódios basais acima do nível do solo, escavando galerias e reduzindo as reservas que serão utilizadas pelas soqueiras no ano seguinte, debilitando as plantas e limitando a longevidade dos canaviais (Bento et al., 1995).

Novaretti et al. (1983) verificaram que as larvas começaram a ser constatadas significativamente na região das raízes da cana a partir dos 11 a 12 meses de idade da cultura (fevereiro-março). Somente no final de abril e maio é que as larvas foram observadas atacando os rizomas da touceira e destruindo os primeiros internódios localizados ao nível do solo. Esse tipo de dano é mais prejudicial do que aquele encontrado apenas nas raízes. A injúria causada aos rizomas e primeiros internódios provoca o secamento e a morte da touceira, afetando o brotamento.

Devido à destruição do sistema radicular, pode haver uma grande redução na absorção de água e nutrientes pelas plantas, levando-as ao secamento e à morte (Bento et al., 2004; Machado et al., 2006a). Em canaviais jovens, as touceiras aparecem parcial ou totalmente secas e as falhas podem ser numerosas; em canaviais mais velhos, as touceiras atacadas apresentam aspecto de canas afetadas por seca ou fogo. Os efeitos são mais evidentes durante os períodos mais frios e secos do ano, quando as plantas estão mais sujeitas a déficit hídrico, sendo

possível encontrar elevado número de larvas junto às touceiras atacadas (Bento et al., 1995).

As larvas de *Migdolus* vão causar danos ao sistema radicular da cana-de-açúcar, que passa a exibir sintomas de seca, iniciando com o secamento das folhas mais velhas. Com a evolução dos sintomas, pode ocorrer o secamento de todas as folhas, morte da gema apical e até o murchamento dos colmos. Os danos podem se estender aos internódios basais dos colmos, prejudicando a brotação das soqueiras nos próximos cortes, o que contribui para o declínio acentuado na produtividade das áreas infestadas e obriga o produtor a renovar precocemente o seu canavial, existindo relatos de renovações de áreas que foram feitas logo após o segundo corte. Ocorre em média uma redução de 25 toneladas/ha/ano nas áreas infestadas, comparadas com parcelas tratadas com inseticidas de solo (Polanczyk et al., 2004).

Segundo Térán et al. (1983), os ataques de *Migdolus*, apesar de serem em reboleiras mais ou menos definidas, chegam a destruir totalmente os canaviais afetados.

Estudos de Machado et al. (2006a) demonstraram que a presença de 3 a 4 larvas por touceira foram consideradas de alto índice, inviabilizando a produção da cultura de cana-de-açúcar, apresentando a necessidade de reforma do canavial. Já as culturas que apresentaram até 2 larvas por touceira de cana foi considerado suportável, de médio índice, apresentando boa produção, com média de 150 toneladas/ha, sendo considerado suportável pela cultura.

Arrigoni (1988a), ao estudar a flutuação da praga, observou grande variação na flutuação populacional de larvas, nas diferentes camadas do solo (0 m a 5 m de profundidade) em função das épocas de amostragem.

Quanto à distribuição populacional desse inseto na lavoura de cana-de-açúcar, a fêmea se desloca, na maioria das vezes, somente no sentido vertical. Presume-se que ela não seja a principal responsável pela dispersão. No entanto, esse fato pode explicar a razão das infestações na cultura se apresentarem em forma de reboleira. É possível que a dispersão dessa espécie seja realizada pelas larvas que se locomovem intensamente, abrindo galerias no solo de até cinco metros de comprimento (Nakano et al., 2001).

Machado et al. (2006a) verificou que alguns produtores mesmo apresentando alto índice de contaminação pelas larvas do *Migdolus*, não optam pela

reforma das reboleiras, devido a essas áreas contaminadas serem extensas, tornando-se inviável economicamente.

2.2. Desenvolvimento biológico de *Migdolus* sp.

Trata-se de uma espécie com metamorfose completa (holometábola), ou seja, com desenvolvimento completo (ovo, larva, pupa e adulto), passando, portanto por 4 estágios (Bento et al., 1995; Bento et al., 2004).

O ciclo biológico de espécies do gênero *Migdolus* é pouco conhecido, com a duração de sua fase larval estimada em dois a três anos (Bento et al., 1995). Uma das maiores dificuldades encontradas pelos pesquisadores para estudar a biologia desse inseto, em condições naturais, é o fato de que as larvas ao se locomoverem pelo solo podem atingir até 3 a 4 metros de profundidade. Além disso, o ciclo biológico é muito longo, podendo ultrapassar mais de 12 meses de duração (Machado, 2006). Estudos de Machado et al. (2006b) confirmaram com as medidas de tamanho das larvas e sua época, que a espécie *Migdolus fryanus* pode apresentar um ciclo biológico variável de 1 a 3 anos.

O ciclo completo de *Migdolus fryanus* (ovo-adulto) tem a duração de dois anos, porém uma parcela da população pode completar o ciclo com três anos (Gallo et al., 2002). A diferença de um ano entre elas justifica-se porque os adultos somente surgem na superfície do solo para o acasalamento, inevitavelmente, durante as revoadas (novembro a março) (Bento et al., 2004).

Em razão da dificuldade de se criar este inseto em laboratório, ainda se desconhece o número exato de ínstaes larvais, embora alguns autores mencionem a ocorrência de pelo menos sete ínstaes (Téran et al., 1983; Arrigoni et al., 1986). Em estudos do desenvolvimento biológico de *Migdolus* em laboratório, Machado et al. (2006b) observaram que, embora as larvas se desenvolvessem, passando por 6 a 7 ecdises e atingiram 4 a 5 cm de comprimento, não alcançaram os estágios de pupa e adulto. Os autores acreditam que, em condições naturais, deve ocorrer algum estímulo para que o inseto complete o seu desenvolvimento e atinja as demais fases do seu ciclo de vida.

O período de incubação dos ovos variou de 17 a 25 dias, segundo estudos de Machado et al. (2006b). Seus ovos têm coloração branco-leitosos e são

colocados em diferentes profundidades no solo, podendo medir de 6 a 7 mm de comprimento (Bento et al., 1995) sendo extremamente frágeis (Machado et al., 2003a). O pico de maior ovoposição ocorre aos 10 dias após a revoada (Arrigoni, 1988a). Cada fêmea põe de 14 a 45 ovos no solo, em diferentes profundidades (Bento et al., 1995). Conforme estudos de Arrigoni (1988a) e Gallo et al. (2002), as fêmeas colocam em média 34 ovos (4-69 ovos/fêmea). Machado et al. (2006b) comentam que o número de ovos depositados por fêmea variou de 19 a 38 (29 em média) e tiveram uma viabilidade entre 65 a 98% (84% em média). Os autores afirmam que o cório do ovo, que possui formato elíptico, é bastante frágil, sendo facilmente rompido por manipulações.

A eclosão das larvas ocorre em média cerca de 21 dias (20-22 dias) após a oviposição, podendo as larvas medir 5 mm de comprimento (Téran et al., 1983; Arrigoni, 1988a; Machado et al., 2003a). As larvas são de coloração branco-leitosa (Téran et al., 1983; Arrigoni, 1988a; Machado et al., 2006b) e ao longo do desenvolvimento embrionário tornam-se amareladas (Machado et al., 2006b). Apresentam forma cerambiciformes (pernas torácicas curtas, vestigiais ou ausentes e segmentação acentuada) e a parte anterior do corpo é mais alargada do que o restante (Téran et al., 1983; Arrigoni, 1988a; Machado et al., 2006b), sendo a cápsula cefálica levemente mais escura (Machado et al., 2006b). Outros autores identificaram que as pernas na fase larval eram atrofiadas, sendo o primeiro par mais desenvolvido que o segundo e o terceiro. A mandíbula é robusta, cortante e bem quitinizada, com os cantos arredondados. As antenas também são rudimentares (Machado et al., 2006b).

Machado et al. (2006b) verificaram que as larvas menores (1 a 2 cm) foram freqüentes no primeiro trimestre, em uma profundidade que variou de 0,5 a 1 m; já as maiores (3 a 5 cm) nos meses de maio a outubro na região de São Paulo. No entanto, foi possível observar sobreposição de larvas com relação ao tamanho durante o estudo.

Nos segmentos abdominais, estão presentes expansões dorsais (Machado et al., 2003a; Machado et al., 2006b). Na região ventral esses segmentos projetam para a lateral, sendo voltadas para parte posterior do corpo, em formato de arcos (Machado et al., 2006b). Essas projeções dos segmentos abdominais funcionam como pseudópodes e auxilia no deslocamento das mesmas pelo interior das galerias

no solo. Quando recém-eclodidas, aparentemente, alimentam-se apenas de matéria orgânica; nos estágios mais avançados nutrem-se do sistema radicular das plantas (Machado et al., 2003a).

No final do desenvolvimento, as larvas podem medir até 60 mm de comprimento (Téran et al., 1983). Essa é a fase mais prejudicial pelo fato de as larvas penetrarem no solo até 5 m de profundidade em busca de raízes das plantas para se alimentarem (Bento et al., 1995).

A maior concentração de larvas nas camadas mais superficiais (0 a 30 cm) coincidiu com os meses mais frios e secos do ano, ou seja, entre maio e agosto na região de São Paulo. Durante os meses de novembro a março (período chuvoso), há uma diminuição nessa população, coincidindo com o aparecimento dos adultos para o acasalamento (revoadas). Geralmente, a partir de fevereiro, há novamente um aumento no número de larvas nas camadas mais superficiais. Essa dinâmica populacional, no entanto, pode sofrer variações de região para região de acordo com as condições edafoclimáticas e de manejo de solo (Terán et al., 1983).

No estágio larval, é que ocorrem as maiores movimentações do inseto no solo, o que favorece a dispersão da espécie (Terán et al., 1983). A metamorfose se procede no solo, nas camadas mais profundas, onde a larva constrói uma câmara pupal (Machado et al. 2003a). A pupa é livre, apresenta coloração branco-amarelada e fica protegida na câmara pupal, geralmente construída abaixo de 1,6 m de profundidade por um estágio de curto período de tempo (Arrigoni, 1988b). Conforme Terán et al. (1983), as pupas podem ser encontradas a profundidades maiores que 3 metros.

A emergência dos adultos ocorre três a quatro meses antes da revoada e, geralmente, abaixo de 1,2 m de profundidade. Inicialmente, esses indivíduos são pouco móveis, permanecendo assim na câmara pupal até o início da época de acasalamento (revoada), quando irão atingir a maturidade sexual. Durante esse período de “dormência”, os adultos apresentam a região abdominal expandida, ultrapassando o ápice dos élitros, sendo muito sensíveis à umidade, o que acredita-se se o fator mais importante para predispor-lo às revoadas após o início das chuvas (Arrigoni, 1988b).

Os machos são ativos e voam, ao passo que as fêmeas apresentam asas membranosas, reduzidas e em forma de pequena lâmina alongada e estreita, não

funcionais (Dias, 1984; Gounelle, 1899; Bento et al., 1995; Gallo et al., 2002; Machado et al., 2003a; Machado et al., 2006b). Conforme experimentos de Machado et al. (2006b), em algumas fêmeas, foi observada uma fusão dos élitros, a partir do terço médio para a região posterior, caracterizando perda de função dessas estruturas para o inseto.

Os machos possuem coloração preta (maioria, castanho-escura ou castanho-avermelhada e medem entre 12,1 a 37,0 mm de comprimento. As fêmeas, por sua vez, são de coloração castanho-avermelhada (maioria) ou castanho-escura e medem entre 19,5 a 35,0 mm de comprimento (Dias, 1984; Bento et al., 1995; Nakano; et al., 2001; Machado et al., 2006b). De acordo com estudos de Machado et al. (2006b), o tamanho dos besouros foi heterogêneo, os machos variaram de 1,5 a 2,6 cm de comprimento (em média 2,1) e as fêmeas de 1,7 a 2,2 cm (em média 1,9).

De acordo com Dias (1984) e Machado et al. (2006b), os machos possuem antenas, atingindo, aproximadamente, o meio do corpo e constituídas de 11 artículos. Os olhos podem apresentar tamanhos variáveis. Nas fêmeas, as antenas possuem oito artículos e são muito mais curtas que as dos machos; os olhos são muito menores que os dos machos e geralmente um pouco salientes.

Machado et al. (2006b) acrescentam ainda que os antenômeros dos machos apresentam escapo curto, ablongo e com pontuação discreta. O artículo 3 é denteado e mais longo que o artículo 4. As fêmeas possuem o 3º artículo mais alongado e mais afilado na base, pouco ou não denteado. O escapo é mais longo e menos ablongo.

Machado et al. (2006b) acrescentam ainda que as mandíbulas são mais desenvolvidas nos machos quando comparadas com as fêmeas e afirma que este fator pode estar relacionado com o fato desses insetos estarem presentes em solos com elevada camada de pedregulho, situada a uma profundidade variável de 40 a 60 cm. Acrescentam ainda que os machos que apresentarem pouco desenvolvimento das mandíbulas terão menor chance de acasalamento, pois as mandíbulas auxiliam na contenção da fêmea durante a cópula e na sua concorrência com outros indivíduos da espécie.

Os adultos de *Migdolus fryanus* são besouros com acentuado dimorfismo sexual (Dias, 1984). Devido às fêmeas serem incapazes de voar, elas saem para a

superfície apenas durante o período de acasalamento, enterrando-se novamente após a cópula (Bento et al., 1995).

Tanto os machos quanto as fêmeas de *Migdolus* sp. não se alimentam e vivem às custas de suas reservas energéticas armazenadas durante a fase larval (Arrigoni et al., 1986).

A longevidade dos seus adultos varia com o sexo, com os machos vivendo de quatro a sete dias e as fêmeas, de sete a 38 dias (Bento et al., 1995). Após o início das revoadas, os machos vivem cerca de cinco dias (4-14 dias) (Arrigoni, 1988a). Em estudo de Machado et al. (2006b), a longevidade dos machos foi menor, vivendo um período de três a nove dias (em média cinco dias); já as fêmeas viveram de 28 a 38 dias (em média 32 dias).

Os adultos sexualmente maduros, após passarem pelo período de “dormência”, sobem à superfície para o acasalamento, necessitando vencer uma barreira física, no caso, o solo. Durante esse trajeto, utilizam, possivelmente, as galerias formadas pela movimentação das larvas, ou simplesmente escavam até atingir a superfície (Bento et al., 1995).

O orifício de saída da fêmea e do macho também é diferenciado, o revolvimento do solo caracteriza-se pela saída da fêmea. Essa observação contribui para coletas no campo, evitando desperdício de tempo, quando se tem como objetivo a fêmea (Machado et al., 2006a).

Os adultos são escavadores e estão presentes fora do solo assim que se iniciam as primeiras chuvas. O aparecimento dos machos é estimulado pelas fêmeas que liberam um feromônio de atração sexual (Bento et al., 1995).

Os acasalamentos de *Migdolus* sp. são muito característicos e ocorrem em dias quentes e úmidos, precedidos por chuvas, entre os meses de novembro a março na região centro-sul do Brasil (Bento et al., 1995).

As revoadas ocorrem de outubro a janeiro, com o aparecimento das primeiras chuvas e duram até sete ou mais dias consecutivos (Nakano et al., 2001). Os machos ficavam muito ativos a partir das 8h da manhã, se deslocando em vôo baixo por distâncias entre 100 e 800 m, sendo capazes de identificar o local de saída da fêmea, com esta ainda em uma profundidade de 10 a 20 cm (Machado et al., 2006a).

Nos dias de revoada (acasalamento), os machos surgem na superfície antes do que as fêmeas (Bento et al., 1995; Nakano et al. 2001; Machado et al., 2006a), permanecendo na vegetação rasteira (plantas silvestres e daninhas), nas folhas e ramos da cultura ou sobre o próprio solo. Quando aparecem, as fêmeas permanecem com a cabeça e o tórax discretamente expostos ou, em alguns casos, caminham sobre a superfície do solo (já que não são capazes de voar) (Bento et al., 1995; Machado et al., 2006a).

Atraído pelo feromônio sexual liberado pela fêmea, o macho voa em baixa altitude, em direção contrária ao vento, e pousa próximo a ela. A partir daí, caminha sob forte excitabilidade, com vigorosos movimentos das antenas (cujas função é detectar o feromônio), até localizar sua parceira (Bento et al., 1992; Bento et al., 1995). Uma vez sobre a fêmea, com o auxílio das mandíbulas, que agem como uma pinça, o macho a segura e realiza a cópula (Bento et al., 1995; Machado et al., 2006a). No caso de a fêmea estar somente com a cabeça e o tórax expostos, o macho também utiliza a mandíbula para retirá-la do solo (Bento et al., 1995). Geralmente, nota-se mais de um macho disputando uma mesma fêmea e múltiplas cópulas podem ocorrer no curto espaço de tempo em que a fêmea permanece exposta, podendo ocorrer em fração de segundo (5 segundos) (Bento et al., 1995, Machado et al., 2003; Machado et al., 2006a). Segundo Machado et al. (2006a), esse comportamento pode estar relacionado com a existência de um número maior de machos que fêmeas para a espécie.

Os machos quando vêm à superfície do solo permanecem durante todo o período de revoada do dia copulando e procurando por fêmeas constantemente, ao passo que as fêmeas ficam por pouco tempo expostas na superfície e retornam imediatamente para o interior do solo após a cópula e nunca mais voltam à superfície. Ao final de um dia de revoada, os machos penetram no solo para retornar no dia seguinte (Bento et al., 1995) e assim continuam até esgotar suas reservas energéticas.

Segundo Bento et al. (2004), as razões que levam esses besouros a retornar para o interior do solo diariamente podem estar relacionadas com a alta temperatura da superfície do solo, que leva esses besouros a penetrarem novamente no solo. Neste caso, as fêmeas são aparentemente mais sensíveis ao calor e aos raios solares do que os machos, como a diminuição da umidade relativa, poderiam

também contribuir para esse padrão de comportamento. De qualquer modo, o mecanismo que regula tal comportamento é endógeno ao indivíduo (ritmo circadiano) e determina suas atividades ao longo do dia.

As fêmeas geralmente são copuladas no primeiro dia em que surgem na superfície do solo (Arrigoni, 1988a; Gallo et al. 2002). Após a cópula, a fêmea penetra imediatamente no solo, onde irá realizar a postura em diversas profundidades, na maioria das vezes, utilizando o mesmo furo de saída, se deslocando verticalmente até uma profundidade de um metro já no primeiro dia (Bento et al., 1995; Machado et al., 2006). Alguns machos podem penetrar no solo pelo mesmo orifício utilizado pela fêmea em busca de acasalamento. Outros se deslocam em direção à outra fêmea, atraídos, novamente pelo feromônio sexual, realizando um novo acasalamento (Machado et al., 2006). Enquanto escava, novas tentativas de cópula podem ocorrer e, não raro, o assédio de outros machos é tão intenso que chegam a mutilar ou matar a fêmea (Bento et al., 1995). Apesar de o macho não morrer após a cópula e, eventualmente, vir a acasalar com outra fêmea, ainda se desconhece a eficiência dessa nova cópula (Bento et. al., 2004).

Outro comportamento ainda pouco esclarecido é onde e como a fêmea produz e libera o feromônio sexual que atrai os machos para o acasalamento (Bento et al., 2004). De acordo com Bento et al. (1992), o tórax da fêmea foi a parte do corpo que mais atraiu os machos para armadilhas. Entretanto, todas as demais partes do corpo (incluindo cabeça e abdome) também atraíram os machos.

Considerando-se que o tórax desse besouro possui uma maior exposição de cutícula dura, parece provável que esse feromônio esteja presente nos hidrocarbonetos cuticulares da fêmea. Outra evidencia é que, mesmo morta, a fêmea é capaz de atrair os machos em armadilhas, o que reforça essa hipótese (Bento et al., 1993). Neste caso, portanto, as fêmeas liberariam o feromônio continuamente. Possíveis novas cópulas por essas fêmeas seriam impossibilitadas, em parte, pelo seu refúgio no subsolo, que agiria como uma barreira física na disseminação do feromônio, ou, ainda, pela baixa longevidade do macho em relação à fêmea (Bento et al., 1995).

Na cultura de cana-de-açúcar, dada à extensa área que ocupa, é comum serem observadas revoadas em áreas relativamente próximas, porém em dias distintos. Tais circunstâncias de acasalamento parecem estar associadas às

condições edafoclimáticas e às diferenças no manejo da cultura (época de plantio, tratos culturais, variedade), ao tipo do solo e à distribuição das chuvas (umidade e percolação da água no perfil do solo) (Bento et al., 2004).

2.3. Manejo e controle

Devido às poucas informações sobre essa praga, ainda não se têm totalmente estabelecidos os níveis de controle. Porém, por meio do método de amostragem ou levantamento de infestação de larvas no campo, medidas de controle devem ser adotadas quando se constatar mais de 2 larvas de *Migdolus* por 10 touceiras ou mais de 10% de touceiras atacadas (Bento et al., 1995).

Os produtores de cana, de uma maneira geral, adotam um sistema de manejo para *Migdolus fryanus* que envolve três tipos de controle: monitoramento, químico e cultural levando em consideração o fato de ser cana planta ou cana soca (Machado et al., 2003a).

O monitoramento de *Migdolus sp.* é um método utilizado para o controle desses besouros, podendo ser realizado por três formas distintas. A primeira delas pode ser realizada durante o levantamento regular de pragas de solo, antes da reforma dos canaviais. Geralmente, a amostragem é realizada, no mínimo, em duas trincheiras por hectare, avaliando-se a população das pragas presentes e classificando-as quanto a espécies e danos causados (Arrigoni, 1988b).

A segunda forma é aquela efetuada nos meses mais frios e secos do ano, observando-se e mapeando os focos de infestação com sintomas de secamento causado pelas larvas. Este modo de monitoramento é pouco eficiente no caso de áreas com baixas e médias infestações, uma vez que os sintomas descritos não se tornam visíveis (Bento et al., 2004).

Uma terceira forma de monitoramento, bastante prática, é a instalação de armadilhas ao nível do solo contendo o feromônio sexual sintético de *Migdolus fryanus*. Recomenda-se utilizar no mínimo uma armadilha para cada 10 hectares a partir do início das chuvas até o final das revoadas, efetuando a troca do feromônio a cada trinta dias (Bento et al., 2004).

O feromônio sexual apresenta boas perspectivas para a coleta massal de *Migdolus fryanus*, considerando-se que o período de acasalamento é restrito a

alguns dias do ano. Esse período é crítico para a sobrevivência do inseto e, se interrompido, pode afetar sua nova geração. Para tanto, as áreas devem ser monitoradas com feromônio sexual a partir do início das chuvas a cada ano. Com o início de revoadas, armadilhas devem ser instaladas a cada 30 metros uma das outras nos carregadores principais, com o propósito de se coletar o maior número de machos na área (Bento et al., 1995).

O uso de feromônio sexual durante o processo de acasalamento (revoada) pode reduzir significativamente as gerações seguintes do besouro (Nakano et al., 2001; Machado e Habib, 2006). A utilização do feromônio sexual sintético de *Migdolus fryanus* tem a função de atrair ou confundir (depende da estratégia) os machos durante as revoadas (Nakano et al., 2001).

De acordo com Leal et al. (1994), o principal componente químico do feromônio sexual de *Migdolus fryanus* é uma amida, o N-(2'S)-methylbutanoyl 2 methylbutylamine. Segundo esse autor, 1,0 mg deste feromônio, quando usado em condições de campo, é capaz de capturar 2,7 vezes mais macho que duas fêmeas virgens juntas. A formulação é em peletes ou pastilhas, insolúveis em água, além de resistir à radiação solar, podem permanecer por vários dias em condições de campo sob chuva.

Apesar da eficiência do controle por feromônio, a possibilidade do produtor realizar coleta massal por intermédio dessas armadilhas é dificultada devido ao seu alto custo de mercado, por se tratar de um produto fabricado fora do Brasil (Machado e Habib, 2006).

A técnica de monitoramento tem o objetivo de acompanhar a evolução da praga na cultura. A cada um ou dois dias devem-se vistoriar as armadilhas para certificar-se da presença ou não de machos de *Migdolus*. Essa técnica é muito útil para se antecipar o uso da coleta massal ou a técnica de confundimento (Nakano et al., 2001).

O tipo de uso de monitoramento deve ser adequado dependendo dos objetivos, pois o monitoramento pode variar dependendo do risco oferecido pela população da praga. A decisão de adotar estes monitoramentos no lugar de produtos químicos está, muitas vezes, no custo dos produtos ou até mesmo quando há impossibilidade de medidas de controle químico em algumas culturas (Bento et al., 2004).

Migdolus fryanus tem sido monitorado com armadilhas de solo iscadas com feromônio sexual. Entretanto, o controle químico, empregando endossulfan e fipronil, aplicados no sulco ou cova de plantio, tem sido o método predominante (Wilcken et al., 2005).

O método do controle químico consiste na aplicação de inseticidas no sulco de plantio, sendo a forma mais empregada para proteção do sistema radicular da cultura e redução de população da praga. Nesse sentido, em cana-de-açúcar, em se tratando de pragas do solo como *Migdolus* sp., busca-se sempre um produto de elevada eficiência e longo poder residual (Nakano et al., 2001; Bento et al., 2004). Essa qualidade é essencial nesta cultura, onde a proteção à cana-planta e às soqueiras deve se estender, pelo menos, por quatro ou cinco cortes, garantindo o retorno econômico da atividade. Nos casos de textura arenosa, em áreas com altas populações da praga é recomendada a aplicação de inseticidas na soleira do arado de aiveca, por ocasião da reforma do canavial, empregando-se equipamento aplicador próprio para esta finalidade (Bento et al., 2004).

No estudo de Botelho et al. (1999), analisando a eficiência de alguns inseticidas para o controle de *Migdolus*, foi verificado que o melhor controle foi obtido com o fipronil nas dosagens de 400 e 300 g./ha.

Dada a importância econômica de *Migodolus* para a cultura da cana-de-açúcar, diversos inseticidas para o uso em solo têm sido testados, mas poucos são utilizados comercialmente. Observa-se que a maioria dos produtos, atualmente, é de uso proibido devido aos efeitos cumulativos no homem e no meio ambiente (Machado e Habib, 2006).

Apesar dos produtores de cana-de-açúcar usarem diferentes métodos para o controle dos *Migdolus* na cultura, o controle químico, por meio do uso de endossulfan e fipronil, aplicados no sulco ou cova do plantio, tem sido o método predominante (Wilcken et al., 2005),

Práticas mecânicas e culturais têm sido de grande utilidade na redução populacional ou na melhoria da cultura sob o ataque de *Migdolus* sp., como a correta destruição das soqueiras de cana (reforma), a incorporação de matéria orgânica e a adubação verde (Nakano et al., 2001; Bento et al., 2004).

A prática do controle cultural traz o inconveniente da necessidade de reforma do canavial e consiste inicialmente da destruição das plantas atacadas (Machado et al., 2003a).

Na correta destruição de soqueiras de cana-de-açúcar (reforma), dois aspectos importantes devem ser considerados: a época de execução do trabalho e os implementos a serem utilizados (Terán et al., 1983; Arrigoni, 1988b).

Estudos de dinâmica populacional de *Migdolus fryanus* demonstram que a época na qual a maior porcentagem de larvas se encontra nos primeiros 20-30 cm do solo coincide com os meses mais frios e secos do ano para a região sudeste, ou seja, de março a agosto (Terán et al., 1983; Arrigoni, 1988b; Nakano et al., 2001). Desse modo, do ponto de vista de controle, a destruição das soqueiras de cana-de-açúcar, quando efetuada nessa época, mesmo que parcialmente, é muito mais efetiva (Bento et al., 2004).

A mortalidade das larvas durante o processo de destruição das soqueiras dos canaviais afetados ocorre pelo revolvimento das camadas de solo até a profundidade de operação do implemento (Bento et al., 2004). Isso ocorre porque, além do dano mecânico do implemento nas larvas, estas ficam expostas na superfície do solo, favorecendo o seu ressecamento (desidratação) e o ataque de formigas carnívoras e de alguns pequenos animais predadores, como os pássaros (Machado et al., 2003a; Bento et al., 2004; Machado e Habib, 2006). Este método de controle, apesar de eficiente, não atinge as larvas que, porventura, estejam abaixo dos 20-30 cm. Além disso, só é efetuado nos canaviais que necessitam de reforma ou que foram inviabilizados economicamente devido ao intenso ataque desse inseto (Bento et al., 2004).

Apesar do método de controle cultural ser eficiente, esse método traz o inconveniente ao produtor da necessidade de reforma antecipada do canavial (Machado e Habib, 2006).

A coleta manual de besouros adultos durante o período das revoadas também é um controle aplicado. Entretanto, é um método dispensioso, pois necessita de grande número de operários para realizá-lo (Nakano et al., 2001).

Até o momento, não há estudos comprovando redução na população de *Migdolus* sp. pela incorporação de matéria orgânica. Entretanto este método favorece o desenvolvimento da cultura, tornando as plantas menos vulneráveis

(mais nutridas) ao ataque das larvas (Bento et al., 1995), pois a matéria orgânica deixa as plantas bem nutridas e enriquece o solo com microorganismos (Nakano et al., 2001).

Existem poucos inimigos naturais conhecidos para o controle biológico de *Migdolus* sp. Entre os insetos que são inimigos naturais de *Migdolus* sp., há as formigas carnívoras, moscas sarcófagídeas e nematóides entomopatogênicos *Neoplectana carpocapsae* e *Caenorhabditis elegans* (Bento et al., 1995).

Machado et al. (2005) verificaram em seus estudos que *Steinernema glaseri* e *Heterorhabditis indica* parasitam diferentes fases do desenvolvimento de *Migdolus fryanus*, tornando-os promissores para uso no controle do inseto em nível de campo. Os autores afirmam ainda que esses nematóides podem parasitar outras pragas da cultura da cana-de-açúcar. Não há registros sobre variedades de cana-de-açúcar resistentes ou tolerantes ao ataque de *Migdolus* sp. em nenhuma das culturas onde foram constatados danos desta praga (Salles, 1998).

Pesquisadores e técnicos reconhecem que não existe um método único e eficiente para o controle de *Migdolus* sp., dadas às inúmeras dificuldades de se atingir as fases biológicas desse inseto no solo. Portanto, um consenso parece indicar que todas as medidas de controle devem ser adotadas em conjunto ou isoladas, quando for o caso, no momento mais propício durante a condução da cultura, para resultar num manejo satisfatório desta praga (Bento et al., 2004).

Não é possível reduzir drasticamente a população de *Migdolus* em um único ano, devido ao seu ciclo de vida longo com superposição de gerações. Isso só será possível gradativamente e os resultados só aparecerão a partir do segundo ou terceiro ano. O uso anual dos métodos de controle contribui para manter um baixo nível da população da praga no campo (Nakano et al., 2001).

2.4. Marcadores moleculares: isoenzimas e RAPD

As isoenzimas, também referidas como isozimas, foram definidas por Markert e Möller (1959). Estes autores consideram as isoenzimas como formas múltiplas de uma mesma enzima, que atuam sobre um mesmo substrato, mas podem digerir seqüências polipeptídicas, cargas elétricas, pesos moleculares, especificidades e cinéticas diferentes dentre outras variáveis.

Comumente, os padrões isozímicos observados podem ser explicados por três mecanismos: a multiplicidade de locos, o alelismo múltiplo e as alterações secundárias da estrutura primária (Hopkinson et al., 1973; Harris, 1980).

O papel fisiológico preciso das múltiplas formas de uma enzima não está bem estabelecido. Sabe-se, entretanto, que algumas destas formas podem existir em diferentes tecidos e órgãos (O'Brien e MaCintyre, 1972 a, b).

Existem evidências de que estas diferentes formas enzimáticas apresentam papel fisiológico distinto nas células. As diversas formas de uma enzima em uma célula catalisam a mesma reação química, mas não necessariamente com a mesma eficiência ou sob as mesmas condições intracelulares (Markert, 1968).

Kaplan (1963) sugere que a multiplicidade molecular, pelo menos para certas enzimas, tem função na diferenciação das células durante o desenvolvimento embrionário, no aumento da adaptabilidade evolutiva dos organismos, na regulação da atividade celular e no crescimento.

A investigação de sistemas isozímicos tem sido extremamente útil para determinar a estrutura e função das enzimas e examinar seu papel no metabolismo celular para estimar o grau de polimorfismo presente nas populações, as diferenças genéticas inter e intraespecíficas, a expressão gênica diferencial durante o desenvolvimento, os efeitos da dosagem gênica na atividade enzimática, a complementação inter e intragênica, heterose e a evolução de genes e organismos (Scandalios, 1975).

Dos vários marcadores moleculares disponíveis na atualidade, as isoenzimas, pela relativa simplicidade e rapidez das análises em relação aos outros marcadores, têm gerado uma enorme gama de informações práticas na identificação de espécies híbridas, populações naturais e cultivadas de diversos organismos vivos (Teixeira et al., 2004).

Os marcadores isoenzimáticos geralmente fornecem ampla informação genética para várias aplicações. A técnica de isoenzimas é relativamente barata e tecnicamente acessível e, embora em número limitado, vários locos podem ser analisados rápida e simultaneamente (Augustin et al., 1999).

As esterases representam o mais extensivo estudo da família das enzimas, por suas diferentes formas geneticamente determinadas por locos distintos e pela sua expressão diferencial em tecidos durante os diferentes estágios do

desenvolvimento ontogenético e da alta frequência das variantes genéticas geralmente detectadas (Ruvolo-Takasusuki et al., 1997).

Esterases de insetos, comparadas com as de mamíferos, não estão bem caracterizadas em termos genéticos e bioquímicos, sendo que entre as melhores estudadas estão as esterases de dípteros. O papel fisiológico das esterases nos insetos permanece em grande parte ainda desconhecido. Contudo, existem evidências de que estas participam da regulação dos níveis de hormônio juvenil (Yoo et al., 1996), da degradação de inseticidas, bem como na quimiotaxia (Krisch, 1971; Motoyama e Dauterman, 1974; Zhu e Brindley, 1990; Prabhakaran e Kamble, 1995), e em outros diferentes processos, incluindo o metabolismo de lipídeos (Zhu e Brindley, 1990).

Outra técnica de eletroforese é o sistema SDS-PAGE, um procedimento importante para a análise de proteínas, podendo ser usado para separar todos os tipos de proteínas (Alberts et al., 2006). O método revela polipeptídios de acordo com seu tamanho e informações sobre a massa molecular que podem ser obtidas usando-se marcador de peso molecular no gel de poliacrilamida (Alfenas, 1998).

Algumas das espécies de insetos são fáceis de identificar e categorizar, enquanto para outros é difícil por causa de seu pequeno tamanho e similaridade morfológica. Além disso, é mais difícil identificar a variação morfológica devido a fatores ambientais por métodos tradicionais disponíveis. Para superar esses problemas, as técnicas de biologia molecular, como PCR (*Polymerase Chain Reaction*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Arbitrary Fragment Length Polymorphism*) e AFLP (*Arbitrary Fragment Length Polymorphism*) têm sido de grande ajuda. Marcadores RAPD têm sido utilizados para inferir sobre a biogeografia da população do inseto e os modos de compreender a evolução e a trajetória evolutiva. Assim, os marcadores RAPD tornaram-se uma ferramenta mais comum para medir as diferenças genéticas entre os indivíduos, dentro e entre espécies (Jain et al., 2010).

Os marcadores RAPDs têm sido amplamente utilizados em estudos filogenéticos de insetos, na identificação de espécies, subespécies ou de diferentes biótipos (Castiglione e Bicudo, 2003).

O interesse em utilizar marcadores RAPD está na sua rapidez, baixo custo e simplicidade da técnica (Harry et al., 1998). A tecnologia de RAPD que utiliza

primers de seqüência arbitrária abriu uma nova perspectiva para a análise genômica de indivíduos e populações, eliminando a necessidade do conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos que flanqueiam a seqüência de DNA de interesse (Suazo et al., 1998). Embora o RAPD seja dominante, este marcador pode apresentar um bom conteúdo informativo, isto é, amostra o genoma em vários locos ao mesmo tempo, identificam um bom número de locos polimórficos por reação (Borowsky, 2001).

Os marcadores RAPD são muito usados para estudos populacionais de variabilidade genética e distância genética (Landry et al., 1993; Ferreira e Grattapaglia, 1998; Lou et al., 1998; Suazo et al., 1998; Waldschmidt et al., 2000, 2002; Oliveira et al., 2004). Estes marcadores também podem ser usados para estudos geográficos de zonas de hibridização, na qual as populações diferem por poucas ou várias características, como resultado do intercruzamento entre populações distintas, podendo fornecer informações sobre o grau de introgressão gênica (Futuyma, 1992). Uma das aplicações mais amplamente utilizadas da técnica de RAPD é a identificação de marcadores ligados a características de interesse, sem a necessidade de mapear o genoma inteiro (Bardakci, 2001).

Nos insetos, a técnica de RAPD tem sido utilizada em estudos filogenéticos, taxonômicos, epidemiológicos, para a obtenção de *fingerprints* genômicos de indivíduos (Castiglione e Bicudo, 2003), para a análise da estrutura e diversidade genética de populações, para a construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e em estudos relacionados à aquisição de resistência aos inseticidas (Castiglione e Bicudo, 2003; Jain et al., 2010).

Como esta técnica pode ser aplicada quando pequenas quantidades de DNA estão disponíveis (Rabouam et al., 1999) permite, dessa maneira, a análise individual de pequenos animais como os insetos.

Até o momento, não foram desenvolvidos estudos com isoenzimas e marcadores moleculares RAPD em populações de *Migdolus*. Contudo, alguns estudos foram realizados com outros Coleopteras.

Martins e Contel (1998) analisaram a presença da enzima málica (ME), isocitrato desidrogenase (IDH), glucose-3-fosfato desidrogenase (G3PDH) e leucine-aminopeptidase (LAP) em *Onthophagus gazella* (Coleoptera: Scarabaeidae).

Martins e Contel (2001) estimaram a variabilidade genética da isozima esterase em besouros africanos *Onthophagus gazella* (Coleoptera: Scarabaeidae) por eletroforese, observando seis regiões de atividades, onde duas eram polimórficas. Os autores afirmam que do total de 23 locos amostrados até o momento nesses insetos, três são polimórficos (13%), o que indica variabilidade genética muito baixa na população estudada.

Pesquisas de resistência a inseticidas em *Oryzaephilus mercator* e *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera; Silvanidae) foram realizadas por Silva e Lapenta (2010). As autoras demonstraram que a tolerância a alguns organofosforados testados pode estar relacionada à variabilidade genética das esterases entre as diferentes linhagens estudadas desta espécie.

Estudos foram realizados em colópteros, comparando-se o grau de polimorfismo gerado pelos marcadores RAPDs e pelas isoenzimas (Harry et al., 1998). Estudos de variabilidade de uma população de *Anthonomus grandis* pela técnica de RAPD demonstraram alto polimorfismo genético (45 a 92%) (Queiroz et al., 2005). Martins et al. (2007) também analisaram duas populações de *Anthonomus grandis* identificando uma variação de polimorfismo entre 52 e 84%.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artmed, 2006. 1463p.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa: UFV, 1998. 574p.
- ALVAREZ, I.A.; CASTRO, P.R.C. Crescimento da parte aérea de cana crua e queimada. **Scientia Agricola**, 56:1069-1079, 1999.
- ARRIGONI, A.B.; DINARDO, L.L.; CONDE, A.J.; TERÁN, F.O. Aplicação de *Neoplectana carpocapsae* Weiser, 1955 em condições de campo para o controle de *Migdolus* sp. (Coleóptera: Cerambycidae). **Nematologia Brasileira**, 10:181-189, 1986.
- ARRIGONI, E.B.; TERÁN, F.O. Áreas afetadas por *Migdolus* sp (Coleoptera: Cerambycidae) em canaviais de unidades cooperadas. **Boletim Técnico Copersucar**, 35:11-13, 1986.
- ARRIGONI, E.B. Biologia de *Migdolus fryanus* Westwood, 1863, em condições controladas: danos preliminares. **Boletim Técnico Copersucar**, 40:24-28, 1988a.
- ARRIGONI, E.B. Flutuação populacional de *Migdolus fryanus* Westwood, 1863, (Coleóptera: Cerambycidae). **Boletim Técnico Copersucar**, 44:22-26, 1988b.
- AUGUSTIN, E.; LOECK, A.E.; STORCH, G.; GRÜTZMACHER, D.D.; AFONSO, A.P.S.; GUSMÃO, L.G. Identificação de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) através de isoenzimas. **Revista Brasileira de Agrociências**, 5:217-220, 1999.
- BARDAKCI, F. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Turkish Journal of Biology**, 25:185-196, 2001.
- BENTO, J.M.S.; ALBINO F.E.; DELLA LÚCIA T.M.C.; VILELA, E.F. Field trapping of *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Cerambycidae) using natural sex pheromone. **Journal of Chemical Ecology**, 18:245-251, 1992.

BENTO, J.M.S.; DELLA LUCIA, T.M.C.; FRIGHETTOR, T.S. Male response to natural sex pheromone of *Migdolus fryanus* Westwood (Coleoptera: Cerambycidae) females as affected by daily climatic factors. **Journal of Chemical Ecology**, 19:2347-2351, 1993.

BENTO, J.M.S.; VILELA, E.F.; DELLA LÚCIA, T.M.C.; LEAL.; W.S.; NOVARETTI, W.E.T. **Migdolus**: biologia, comportamento e controle. Salvador: 1995. 58p.

BENTO, J.M.S. *Migdolus*: perspectivas para o controle. **STAB**, 16:14-15, 1998.

BENTO, J.M.S.; LUCIA, T.M.C.D.; VILELA, E.F.; ARRIGONI, E.B.; LEAL, W.S. **Migdolus**. In: SALVADORI, J.R. Pragas do solo o Brasil. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2004, 544p.

BOROWSKY, R.L. Estimating nucleotide diversity from random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 18:143-148, 2001.

BOTELHO, P.S.M.; MACEDO, N.; CASALI, I.J.; STUPIELLO, J.J.; RIBEIRO, L.D. Controle Químico de *Migdolus fryanus* Westwood (Coleoptera: Cerambycidae) em Quatro Cortes de Cana-de-Açúcar. **STAB, Tecnologia e Pesquisa**, 18:38-40, 1999.

CASTIGLIONI, L.; BICUDO, H.E.M.C. Utilização da técnica de RAPD-PCR para estudos em genética molecular de insetos. **Revista UNORP**, 3:79-93, 2003.

CROWSON, R.A. **The natural classification of the families of Coleoptera**. Oxford: E.W. Classey, 1955. 187p.

DEL LAMA, M.A. **Estudos genéticos e bioquímicos das isoenzimas de malato desidrogenase de *Apis mellifera***. São Paulo: FMRP-USP, 1982, 104p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biologia Genética).

DIAS, M.M. Revisão da subfamília Anoplodermatinae. Parte I Tribo Anoplodermatini. Gênero *Migdolus* Westwood, 1863. (Coleoptera: Cerambycidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, 28:507-535, 1984.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; FERRAZ, L.C.C.B. Patogenicidade de *Pratylenchus brachyurus* e *P. zae* a duas variedades de cana-de-açúcar. **Brazilian Nematological**, 15:9-16, 1991.

DUFFY, E.A. **A monograph of immature stages of British and imported timber beetles (Cerambycidae)**. London: British Museum (Natural History), 1953, VIII, 355p.

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

FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992.

GALLO, D.; ALVES, S.B.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; CARVALHO, R.P.L.; LOPES, J.R.S.; MARCHINI, L.C.; NAKANO, O.; NETO, S.S.; OMOTO, C.; PARRA, J.R.P.; VENDRAMIM, J.D.; ZUCCHI, R.A. **Entomologia Agrícola**, 86:450-462, 2002.

GOES, T.; MARRA, R.; SILVA, G.S. Setor sucroalcooleiro no Brasil situação atual e perspectivas. **Revista de Política Agrícola**, 17:39-51, 2008.

GOUNELLE, E. Note sur le genre *Migdolus* et description de la femelle du *Migdolus fryanus* West. (Col.). **Bulletim de la Societe Entomogique de France**, 5:276-277, 1899.

GUÉRIN-MÉNÈVILLE, F.E. Description de deux genres nouveaux de la famille des longicornes. **Revista de Zoologia**, 5:276-277, 1840.

GUIMARÃES, L.T.; TURETTA, A.P.D.; COUTINHO, H.L. Uma proposta para avaliar a sustentabilidade da expansão do cultivo da cana-de-açúcar no estado do Mato Grosso do Sul. **Sociedade e Natureza**, 22:313-327, 2010.

HARRIS, H. **The principles of human biochemical genetics**. New York: Elsevier/North-Holland, 1980, 554p.

HARRY, M.; ROBIN, S.; LACHAISE, D. Use of polymorphic genetic markers (RAPDs) in evolutionary and applied entomology. **Societe Entomologique de France**, 34:9-32, 1998.

HOPKINSON, D.A.; MESTRINER, M.A.; CORTNER, J.; HARRIS, H. Esterase D: a new human polymorphism. **Annals of Human Genetics**, 37:119-137, 1973.

JACON, H.O que vai pelo setor. **Informativo Ascana**, 95:2-2, 2010.

JAIN, S.K.; NEEKHRA; PANDEY, D.; JAIN, K. RAPD marker system in insect study: A review. **Indian Journal of Biotechnology**, 9:7-12, 2010.

KAPLAN, N.O. Symposium on multiple forms of enzymes and control mechanisms. I. Multiple forms of enzymes. **Bacteriological Reviews** 27:155-169, 1963.

KASTEN JUNIOR, P.; DONZELLI, J.L.; STRINI JUNIOR, A.E.; SACOMANO, J.B.; VILHENA, E.O. Ocorrência de *Migdolus* sp. e insetos associados em solo de textura arenosa (Areias quartzosas). **Boletim Técnico Copersucar**, 32:29-32, 1985.

KAWAMURA, S.M.; RAMOS, H.R.; ALMEIDA, M.I.R. Estratégias de internacionalização do setor sucroalcooleiro do Brasil: um estudo de caso da Cosan. In: **XXIII Congresso Internacional de Estratégia SLADE**, 1:1-23, 2010.

KRISCH, K. Carboxylic ester hydrolases. In: **The enzymes**. New York: Academic Press, 5:43-69, 1971.

LANDRY, B.S.; DEXTRAZE, L.; BOIVIN, G. Random amplified polymorphic DNA markers for DNA fingerprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species (Hymenoptera: Mymaridae and Trichogrammatidae) used in biological control programs of phytophagous insects. **Genome**, 36:580-587, 1993.

LEAL, W.S.; BENTO, J.M.S.; VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. Female sex pheromone of the longhorn beetle *Migdolus fryanus* Westwood: N-(2'S)-methylbutanoyl 2-methylbutylamine. **Experientia**, 50:853-856, 1994.

LOU, K.F.; WEISS, M.J.; BRUCKNER, P.L.; MORRILL, W.L.; TALBERT, L.E.; MARTIN, J.M. RAPD Variation within and among geographic populations of wheat stem sawfly (*Cephus cinctus* Norton). **Journal of Heredity**, 89:329-335, 1998.

MACHADO, M.F.P.S. **Isoenzimas da desidrogenase málica em abelhas do gênero Plebéia**: controle genético e dados populacionais. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1982. 198p. Dissertação (Mestrado em Genética).

MACHADO, L.A.; HABIB, M.; LEITE, L.G.; GOULART, R.M.; TAVARES, F.M.; CALEGARI, L.C.; LAINETI, D.O. Controle de *Migdolus fryanus* na cultura da cana-de-açúcar com nematóides entomopatogênicos. In: REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO. Catanduva, 2003. **Resumos...** Catanduva: USP. 2003, p. 70-78.

MACHADO, L.A.; HABIB, M.; LEITE, L.G.; CALEGARI, L.C.; GOULART, R.M.; TAVARES, F.M. Patogenicidade de nematóides entomopatogênicos a ovos e larvas de *Migdolus fryanus* (Westwood, 1983) (Coleóptera: Vesperidae). **Biologia**, 72:221-226, 2005.

MACHADO, L.A. **Estudos biológicos e comportamentais de *Migdolus fryanus* (westwood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae) e sua interação com nematóides entomopatogênicos e outros agentes de mortalidade**. São Paulo: Universidade Estadual de Campinas. 2006. 141p. Tese (Doutorado em Parasitologia).

MACHADO, L.A.; HABIB, M. *Migdolus fryanus* (Westwood, 1983) (Coleóptera: Vesperidae): praga da cultura de cana-de-açúcar. **Biologia**, 73:375-381, 2006.

MACHADO, L.A.; HABIB, M.; LEITE, L.G.; MENDES, J.M. Estudos ecológicos e comportamentais de *Migdolus fryanus* (Westwood, 1983) (Coleóptera: Vesperidae) em cultura de cana-de-açúcar em quatro municípios do estado de São Paulo. **Biologia**, 73:227-233, 2006a.

MACHADO, L.A.; HABIBI, M.; LEITE, L.G.; CARREGARI, L.C. Aspectos biológicos e morfológicos de *Migdolus fryanus* (Westwood, 1983) (Coleóptera: Vesperidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, 73:447-454, 2006b.

MARKERT, C.L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 45:753-763, 1959.

MARKERT, C.L. The molecular basis of isozymes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 151:14-40, 1968.

MARTINS, E.; CONTEL, E.P.B. Isoenzimas do besouro africano *Onthophagus gazella* Fabricius (Scarabaeidae): Enzima málica (ME), Glicerol fosfato desidrogenase (GPDH), Isocitrato desidrogenase (IDH) e leucina-aminopeptidase (LAP). **Revista Brasileira de Biologia**, 58:39-46, 1998.

MARTINS, E.; CONTEL, E.P.B. African dung beetle *Onthophagus gazella* fabricius (Coleoptera: Scarabaeidae) esterase isozymes. **Brazilian Journal of Biology**, 61:645-650, 2001.

MARTINS, W.F.; AYRES, C.F.; LUCENA, W.A. Genetic diversity of Brazilian natural populations of *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), the major cotton pest in the New World. **Genetics and Molecular Research**, 27:23-32, 2007.

MOTOYAMA, M.; DAUTERMAN, W.C. The role of non-oxidative metabolism in organophosphorous resistance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 22:350-355, 1974.

NAKANO, O.; ROMANO, F.C.B.; PESSINI, M.M.O. **Pragas do Solo**. Campinas: Piracicaba: ESALQ, 2001, 213p.

NOVARETTI, W.R.T.; NELLI, E.J.; CARDERÁN, J.O. Controle químico do *Migdolus* na cultura da cana-de-açúcar – cana de ano e meio. **Boletim Técnico Copersucar**, 24:33-39, 1983.

O'BRIEN, S.J.; MAcINTYRE, R.J. The α -glycerophosphate cycle in *Drosophila melanogaster*. I. Biochemical and development aspects. **Biochemical. Genetics.**, 7:141-161, 1972a.

O'BRIEN, S.J.; MAcINTYRE, R.J. The α -glycerophosphate cycle in *Drosophila melanogaster*. II. Genetic aspects. **Genetics**, 71:127-138, 1972b.

OLIVEIRA, R.C.; NUNES, F.M.F.; CAMPOS, A.P.S.; VASCONCELOS, S.M.; ROUBIK, D.; GOULART, L.R.; KERR, W.E. Genetic divergence in *Tetragonisca angustula latreille*, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, 27:181-186, 2004.

POLANCZYK, R.A.; ALMEIDA, L.C.; PADULLA, L.; ALVES, S.B. Pragas de cana-de-açúcar x métodos alternativos de controle. **Revista Biotecnologia e Ciência e Desenvolvimento**, 33:14-17, 2004.

PRABHAKARAN, S.; KAMBLE, S.T. Purification and characterization of an esterase isozyme from insecticide resistant and susceptible strains of German cockroach, *Blattella germanica* L. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 25:519-524, 1995.

QUEIROZ, O.R.; MARTINS, E.S.; MONNERAT, R.G.; LIMA, L.H.C. Caracterização molecular de uma população de *Anthonomous grandis* (Coleóptera: Curculionidae) utilizando marcadores moleculares RAPD. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 90:1-19, 2005.

RABOUAM, C.; COMES, A.M.; BRETAGNOLLE, V.; HUMBERT, J.; PERIQUET, G.; BIGOT, Y. Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. **Molecular Ecology**, 8:493-503, 1999.

RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; DEL LAMA, M.A.; SOARES, A.E. Genetic characterization of a new *Apis mellifera* esterase. **Apidologie**, 28:259-267, 1997.

SALLES, J.F. **Uso de *Acetobacter diazotrophicus* como vetor para expressão do gene cryIIIA de *Bacillus thuringiensis*, visando o controle de coleópteros na lavoura canavieira**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1998. 64p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal).

SCANDALIOS, J.G. Genes, isozymes and evolution. In: Market, C.L. **Isozymes: genetics and evolutions**. New York: Academic, 1975, p.1-7.

SILVA, G.A.R.; LAPENTA, A.S. Genetic variability in esterases and the insecticide resistance in brazilian strains of *Oryzaephilus mercator* and *Oryzaephilus*

surinamensis (Coleoptera: Silvanidae). **Bulletin of Entomological Research**, 100:1-9, 2010.

SOUZA, M.A. A dinâmica territorial do agronegócio sucroalcooleiro e o zoneamento agroecológico da cana-de-açúcar: notas para um debate. **Revista Pegada**, 11:172, 2010.

SUAZO, A.; MCTIERNAN, R.; HALL, H.G. Differences between African and European honey bees (*Apis mellifera* L.) in Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). **Heredity**, 9:32-36, 1998.

SVÁCHA, P.; WANG, J.; CHEN, S. Larval morphology and biology of *Philus antennatus* and *Heterophilus punctulatus*, and systematic position of the Philinae (Coleoptera: Cerambycidae and Vesperidae) **Annales de la Societe Entomologique de France**, 33:323-369, 1997.

TEIXEIRA, A.S.; CHAVES, L.S.; YUYAMA, K. Esterases no exame da estrutura populacional de camucamu (*Myrciaria dúbia* (Kunth) Mc Vaugh-Murtaceae). **Acta Amazônia**, 34:89-96, 2004.

TERÁN, F.O.; NOVARETTI, W.R.T.; KASTEN JUNIOR, P. *Migdolus* sp. e insetos associados. In: **REUNIÃO TÉCNICA AGRONÔMICA “PRAGAS DA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR**, 1983, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: Copersucar, 1983. p. 25-31.

WALDSCHMIDT, A.M.; BARROS, E.G.; CAMPOS, L.A.O. Molecular marker distinguishes subspecies *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Genetics and Molecular Biology**, 23:609-611, 2000.

WALDSCHMIDT, A.M.; MARCO JUNIOR, P.; BARROS, E.G.; CAMPOS, L.A.O. Genetic Analysis of *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) with RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology**, 62:923-928, 2002.

WILCKEN, C.F.; ORLATO, C.; OTTATI, A.L.T. Ocorrência DE *Migdolus fryanus* (COLEOPTERA: CERAMBYCIDAE) em plantios de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. **Revista Árvore**, 29:171-173, 2005.

YOO, C.M.; CHUN, B.B.; HYUNG, C.L. Substrate and inhibitor specificities of esterase in *Lucilia illustris*. **Korean Journal of Systematic Zoology**, 39:110-117, 1996.

ZHU, K.Y.; BRINDLEY, W.A. Properties of esterases from *Lygus hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae) and the roles of the esterases in insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, 83:725-727, 1990.

CAPÍTULO I

Caracterização bioquímica das esterases e proteínas totais de *Migdolus* sp. (Coleoptera, Vesperidae)

RESUMO

As esterases são hidrolases que apresentam diferentes formas moleculares e são estudadas nos diferentes tecidos e fases do desenvolvimento de insetos. Essas isoenzimas atuam no metabolismo intermediário participando da detoxificação do inseto na presença de agroquímicos. Várias esterases têm sido associadas com a resistência a inseticidas. Como o Coleoptera *Migdolus* é uma importante praga da cana de açúcar e sua biologia não é bem conhecida, causando dificuldade no seu controle e manejo, foi desenvolvida a caracterização bioquímica das esterases e das proteínas totais desse inseto. Nos extratos de cabeça/tórax de machos foram identificadas sete esterases, sendo a EST-5 uma β -esterase e as demais $\alpha\beta$ -esterases. O padrão de inibição possibilitou classificar a EST-1 como colinesterase I, EST-2 e EST-5 como carboxilesterases e EST-7 como arilesterase; sendo que essas isoenzimas podem participar de mecanismos de resistência a inseticidas. Nas análises SDS-PAGE foi observado que o perfil de proteínas totais de extratos de cabeça/tórax de machos apresentou maior número de peptídeos que os extratos de fêmeas. Essa diferença pode estar relacionada com o dimorfismo sexual dos dois sexos e esses peptídeos podem estar atuando nos mecanismos reprodutivos. Os marcadores analisados têm potencial para ampliar o entendimento da biologia de *Migdolus*, contribuindo para o desenvolvimento de métodos de manejo e controle.

Palavras-chave: isoenzimas, marcador molecular, SDS-PAGE

**Biochemical characterization of esterases and total proteins of *Migdolus* sp.
(Coleoptera, Vesperidae)**

ABSTRACT

The esterases are hydrolases that have different molecular forms and are studied in different tissues and developmental stages of insects. These isoenzymes act participating in intermediary metabolism of insect detoxification in the presence of agrochemicals. Several esterases have been associated with resistance to insecticides. As the Coleoptera *Migdolus* is an important pest of sugarcane and its biology is not well known, causing difficulty in its control and management, was developed biochemical characterization of esterases and total protein of this insect. In extracts of head / thorax of males identified seven esterases, and EST-5 is a β -esterase and other $\alpha\beta$ -esterases. The pattern of inhibition made it possible to classify EST-1 as cholinesterase I, EST-2 and EST-5 as carboxylesterases and EST-7 as arylerase, and these isoenzymes may participate in mechanisms of resistance to insecticides. In SDS-PAGE analysis it was observed that the profile of total protein from extracts of head / thorax males had a higher number of peptides that extracts of females. This difference may be related to the sexual dimorphism in both sexes, and these peptides may be acting in reproductive mechanisms. The markers analyzed have the potential to broaden the understanding of the biology of *Migdolus* contributing to the development of methods of management and control.

Key words: isozymes, molecular markers, SDS-PAGE.

1. INTRODUÇÃO

O aumento na produção da cultura da cana-de-açúcar e o desenvolvimento do setor sucroalcooleiro têm fortalecido o agronegócio brasileiro e, conseqüentemente, promovido o crescimento da economia do País (Guimarães et al., 2010). O Brasil vem se destacando nos mercados de açúcar e de álcool como um dos principais países produtores, consumidores e exportadores por causa de sua competitividade na produção de cana-de-açúcar (Satolo e Bacchi, 2009).

O cultivo da cana-de-açúcar é bastante complexo, podendo ser obtido de um único plantio cinco a sete colheitas, sendo que após cada ciclo devem ser feitos altos investimentos para que a renovação do canavial proporcione boa produtividade na colheita seguinte. Dentre esses investimentos, encontra-se o custo com inseticidas para o controle de insetos praga, como o *Migdolus fryanus* West., que causam sérios prejuízos à cultura (Machado et al., 2006).

Os coleópteros do gênero *Migdolus* são conhecidos por sua grande capacidade destrutiva. Os danos são provocados por suas larvas, que se alimentam e destroem o sistema radicular de plantas. O controle é extremamente difícil, pois essas larvas atingem profundidades de até 5 m no solo (Arrigoni 1988). Os prejuízos econômicos são significativos para diversas culturas, notadamente para cana-de-açúcar, amoreira e eucalipto. O centro-sul do Brasil é a região mais afetada e, aparentemente, é o centro de origem (Bento et al., 1995; Bento et al., 2004).

Nos locais de alta infestação, é possível que haja a necessidade de replantio ou reforma das áreas afetadas já no primeiro ano. A reforma da área seguida de um novo plantio representa uma perda considerável, pois envolve a alocação de máquinas, insumos e mão-de-obra. Neste caso, os custos de produção tornam-se ainda mais elevados e os ganhos finais, reduzidos (Bento et al., 2004).

A diferença entre fêmeas e machos de *Migdolus* está relacionada com a sua reprodução, garantindo adaptação às diferentes culturas. Conforme Machado et al. (2006), o *Migdolus* apresenta um grande dimorfismo sexual, sendo observado que algumas fêmeas apresentavam uma fusão dos élitros, caracterizando perda de função dessas estruturas para o inseto. Os autores acreditam que esse dimorfismo sexual tão acentuado entre machos e fêmeas pode ser devido a genes presentes

nos cromossomos sexuais que não apresentam recombinação, levando à formação de estruturas que caracterizam ambos os sexos da espécie.

Devido à falta de dados sobre a genética dos *Migdolus*, a técnica de eletroforese *Polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE) e *sodium dodecyl sulphate/Polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS/PAGE) pode contribuir para a caracterização dos sexos e espécie e até mesmo na identificação de marcadores moleculares para populações resistentes.

Dentre os sistemas enzimáticos, as esterases são eficientes para catalisar a hidrólise de uma ampla variedade de ésteres alifáticos e aromáticos, amidas e tioésteres, assim como em muitos processos diferentes, incluindo a degradação de acetatos que ocorrem entre os componentes de feromônios. Além disso, essas enzimas apresentam uma ampla distribuição tecidual durante o desenvolvimento dos insetos (Pedroso et al., 2002).

Com base na sensibilidade aos substratos sintéticos que essas enzimas hidrolizam *in vitro*, dois grupos podem ser distinguidos nos insetos: as α -esterases, que hidrolisam preferencialmente o α -natifil-esterase; e as β -esterases, que hidrolisam preferencialmente o β -natifil-esterase (Oakeshott, et al., 1993; Tavares et al., 1998; Carvalho et al., 2003).

Os mecanismos comumente associados à resistência aos inseticidas químicos estão divididos em várias categorias, entre elas o mecanismo metabólico, por meio da superexpressão de enzimas de detoxificação do organismo como as esterases, oxidases e Glutathione S-transferase (GST). As esterases compreendem um grupo de enzimas não-específicas que estão envolvidas, principalmente, na resistência aos inseticidas organofosforados (Small e Hemingway, 2000).

As isoenzimas esterases podem ser agrupadas em quatro classes distintas, dependendo da especificidade quanto ao substrato, sensibilidade a inibidores e aos resíduos de aminoácidos no sítio ativo (Oakeshott et al., 1993). De acordo com essa classificação tem-se: carboxilesterases (EC 3.1.1.1); colinesterases (acetilcolinesterases (EC 3.1.1.7) e pseudocolinesterases (EC 3.1.1.8)); acetilesterases (EC 3.1.1.6) e arilesterases (EC 3.1.1.2).

O papel realizado pelas esterases nos mecanismos de resistência aos inseticidas tem sido amplamente estudado em insetos, mostrando-se de fundamental importância. Duas classes de esterases estão envolvidas neste

processo, as colinesterases e as carboxilesterases. Dentre as colinesterases, a acetilcolinesterase regula os níveis de acetilcolina por catalisar a hidrólise desta nos terminais dos impulsos nervosos. Inseticidas organofosforados e carbamatos ligam-se ao sítio ativo desta enzima e a inibem irreversivelmente, gerando um acúmulo de acetilcolina, resultando na morte do inseto (Aldridge, 1950). Outras colinesterases podem estar relacionadas com processos de detoxificação metabólica como a EST-9 em *Drosophila melanogaster* (Healy *et al.*, 1991).

Estudos de resistência aos inseticidas químicos por meio de esterases vêm sendo realizados em *Leucoptera coffeella* (Siquieroli *et al.*, 2004), *Diatraea saccharalis* (Ruvolo-Takasusuki *et al.*, 2002, Lopes, 2009), *Tetragonisca angustula* e *T. fiebrigi* (Stuchi, 2009), *Oryzaephilus mercator* e *Oryzaephilus surinamensis* (Silva e Lapenta, 2010), dentre outros.

A termoestabilidade das isoenzimas em especial as esterases pode contribuir para o entendimento da sua estrutura e função, auxiliando os estudos de polimorfismos isoenzimáticos. Ruvolo-Takasusuki *et al.* (1998) verificaram que a atividade relativa da EST-2 de *Apis mellifera* pode ser detectada eletroforeticamente quando os extratos de abdômen são incubados previamente a 50, 55 e 60°C durante 8 minutos.

Sabe-se que algumas esterases de insetos estão envolvidas no processo de resistência a inseticidas. O conhecimento da base genética dessa resistência é importante para estabelecer estratégias de controle dos insetos.

Assim, nesse estudo foi realizada a identificação, a caracterização funcional, a termoestabilidade das esterases e a análise das proteínas totais em *Migdolus* visando a contribuir com ao entendimento dos mecanismos que determinam a resistência a inseticidas usados no controle destes insetos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Para o desenvolvimento dessa pesquisa, foram utilizados adultos de *Migdolus* de duas localidades na região noroeste do Paraná, sendo coletados fêmeas de amoreiral da Bratac, de Umuarama, e machos da Usina de Álcool de Colorado, entre fevereiro e março de 2008 e 2009.

Os machos de *Migdolus* foram coletados na Usina de Álcool de Colorado com o auxílio das armadilhas utilizadas no controle com feromônios sintéticos. Após as revoadas, os machos eram atraídos pelo feromônio sintético e capturados pelas armadilhas, sendo transportados vivos para o laboratório.

As fêmeas foram capturadas vivas pelo método de coleta manual. Após os dias de chuva, iniciava as revoadas, quando as fêmeas saíam para o acasalamento. Como as fêmeas não voam, as mesmas eram coletadas manualmente com o auxílio de luvas.

Foram utilizados 224 adultos de *Migdolus* sp., para as análises de caracterização das esterases e proteína total, e 80 indivíduos para as análises de inibição e termoestabilidade, totalizando 304 indivíduos.

O material coletado foi levado imediatamente para o laboratório e realizado o sacrifício a baixas temperaturas, sendo, posteriormente estocados a -20°C por, no máximo 30 dias, para as análises de esterase e 60 dias para as análises de proteína total SDS/PAGE.

2.2. Eletroforese PAGE e SDS/PAGE

Todo o processo de extração de proteínas foi realizado mantendo-se as amostras resfriadas. Para análise das esterases, foram utilizados a cabeça/tórax de machos de *Migdolus*, os quais foram homogeneizados individualmente em tubos de propileno 1,5 mL, contendo 200 μL de solução de extração com 0,1% de 2-mercaptoetanol e 10% de glicerol macerados, com o auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, as mesmas foram centrifugadas em centrífuga com 56.000 xg durante

15 minutos em 4°C. Após a centrifugação, foram aplicados 20 µL de sobrenadante no gel.

As isoenzimas esterases foram detectadas por meio da técnica de eletroforese em géis de poliacrilamida (PAGE) em sentido vertical. Os géis PAGE foram preparados nas concentrações de 9% para visualização e 5% para empilhamento. Os volumes dos componentes utilizados para o preparo dos géis estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 – Soluções e volumes utilizados no preparo do gel PAGE para esterases das amostras de cabeça/tórax de *Migdolus* sp.

Reagente	Gel de Separação (9%)	Gel de Empilhamento (5%)
Acrilamida/Bis	(T = 30,8%; C = 2,6%) – 4,5 mL	(T = 10,5%; C = 4,8%) – 3,0 mL
Tris-HCL	(1,5 M, pH 8,8) – 4,5 mL	(0,24 M, pH 6,8) – 3,0 mL
Água	7,2 mL	30 µL
Persulfato de Amônia (PSA) a 2%	320 µL	250 µL
TEMED	15,8 µL	3 µL

A corrida eletroforética para esterases foi realizada em uma voltagem de aproximadamente 200 V por 5h30min, em tampão Tris-Glicina 0,1 M pH 8,3.

As proteínas solúveis foram extraídas da cabeça/tórax de machos e fêmeas de *Migdolus*, com o mesmo tampão e procedimentos descritos para esterase. Após a centrifugação das amostras foram retirados 15 µL do sobrenadante para eletroforese SDS/PAGE que foram transferidos para tubos de 0,2 mL, adicionados 15 µL de tampão contendo solução de azul de bromofenol, mais SDS a 10% e aquecidos em banho-maria a 97°C por 3 min. No gel foram aplicados 15 µL de cada amostra. O padrão de peso molecular de 10-220 Kda utilizado foi o BenchMark (Invitrogen).

Os géis de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS/PAGE) para proteínas totais foram preparados a 7% para géis de visualização e 5% para os géis de empilhamento. Os volumes dos componentes utilizados para o preparo dos géis estão descritos no Quadro 2.

A corrida eletroforética para a eletroforese SDS/PAGE foi realizada a 90V. por aproximadamente 5h30min, em tampão Tris-Glicina 0,1 M pH 8,3, acrescentados 5mL de SDS a 10%.

As isoenzimas esterases (EC 3.1.1.1) foram evidenciadas incubando o gel a 37 °C por 30 min em 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,2. Após o período de incubação, a solução foi descartada e adicionou-se a solução de coloração, contendo 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,2; 5 mL de N-propanol; 0,06g de Fast Blue RR Salt e os substratos 0,02 g β -naftil acetato e 0,03g de α -naftil acetato, dissolvidos em 1 mL de acetona. Em seguida, os géis foram novamente incubados a 37 °C até o aparecimento das bandas.

Quadro 2 – Soluções e volumes utilizados no preparo do gel SDS-PAGE das amostras de cabeça/tórax de *Migdolus* sp.

Reagente	Gel de Separação (7%)	Gel de Empilhamento (5%)
Acrilamida/Bis	(T = 30,8%; C = 2,6%) – 3,5 mL	(T = 10,5%; C = 4,8%) – 3,0 mL
Tris-HCL	(1,5 M, pH 8,8) – 4,0 mL	(0,24 M, pH 6,8) – 3,0 mL
Água	8,2 mL	30 μ L
Persulfato de Amônia (PSA) a 2%	320 μ L	250 μ L
TEMED	15,8 μ L	3 μ L
SDS a 10%	107 μ L	42 μ L

A coloração das proteínas totais foi realizada incubando os géis em uma solução com 100 mg de azul brilhante de comassie e 100 mL da solução PAGE (45% de etanol, 10% de ácido acético glacial em 45% de água destilada), por um período de de 24 horas. O excesso de corante e detecção das bandas ocorreu submetendo os géis a sucessivas lavagens com solução PAGE.

Os géis corados permaneceram em solução conservante, contendo ácido acético a 75% e 10% de glicerol dissolvidos em 1000 mL de água destilada, por pelo menos 24 horas. Após esse tratamento, os géis foram fotografados, embebidos em gelatina a 5% e acondicionados entre duas folhas esticadas de papel celofane e colocados para secagem por um período de 24-48 horas (Ceron et al., 1992).

2.3. Teste de inibição

A caracterização bioquímica foi realizada por meio da análise de inibição como descrito por Healy et al. (1991).

As amostras homogeneizadas e centrifugadas foram aplicadas duas vezes no gel de poliacrilamida (PAGE). Os inibidores utilizados foram: o organofosforado malathion 2,4 mM, o reagente sulfidril para-cloro-mercúrio-benzoato p-CMB 1,6 mM e sulfato de eserina 1,8 mM, diluídos separadamente em 100 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M pH 6,2). A coloração foi realizada cortando o gel em duas partes: controle e inibição. A metade reservada para controle foi incubada por 30 min em 50 mL da solução tampão fosfato de sódio (0,1 M pH 6,2) e a metade, reservada ao teste de inibição, foi incubada em 50 mL do tampão fosfato de sódio (0,1 M pH 6,2) acrescentado o inibidor a ser testado. Após o período de incubação, a coloração ocorreu normalmente para o controle. Porém, para o teste de inibição, na solução de coloração foi acrescentado um dos inibidores. Após a visualização das bandas, foi realizada a comparação entre os géis controle e inibição, visualizando a presença ou ausência das bandas.

2.4 Termoestabilidade

O teste de termoestabilidade para as esterases foi realizado por meio de pré-incubação das amostras por 5 minutos nas seguintes temperaturas: 52°C; 55°C; 57°C; 60°C; 65°C e 70°C. Após a incubação, 10 µL do sobrenadante foram aplicados no gel PAGE e submetido à corrida eletroforética. As amostras controle não foram submetidas ao aquecimento. Após a corrida eletroforética, os géis foram corados para visualização das esterases como descrito anteriormente. Os dados foram analisados verificando a redução parcial da atividade relativa dos *locus*, ausência da atividade relativa ou presença da atividade relativa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises eletroforéticas das esterases em extratos de cabeça e tórax de machos de *Migdolus* sp. permitiram observar sete regiões de atividade esterásica. Não houve diferença no número de regiões quando comparado separadamente extratos de cabeça/tórax e somente tórax.

A esterase mais catódica foi denominada de EST-1 e a mais anódica de EST-7 (Figura 1). Todas as esterases detectadas são $\alpha\beta$ -esterases, exceto a EST-5 que foi denominada como β -esterase, pois foi corada com o substrato β -naftil acetato.

As EST-5 e EST-6 são polimórficas e há sobreposição de bandas quando o indivíduo é heterozigoto para um dos locos. Contudo, foi possível verificar que essas isoenzimas apresentam estrutura quaternária monomérica, pois os heterozigotos apresentaram padrão de duas bandas (Figura 1).

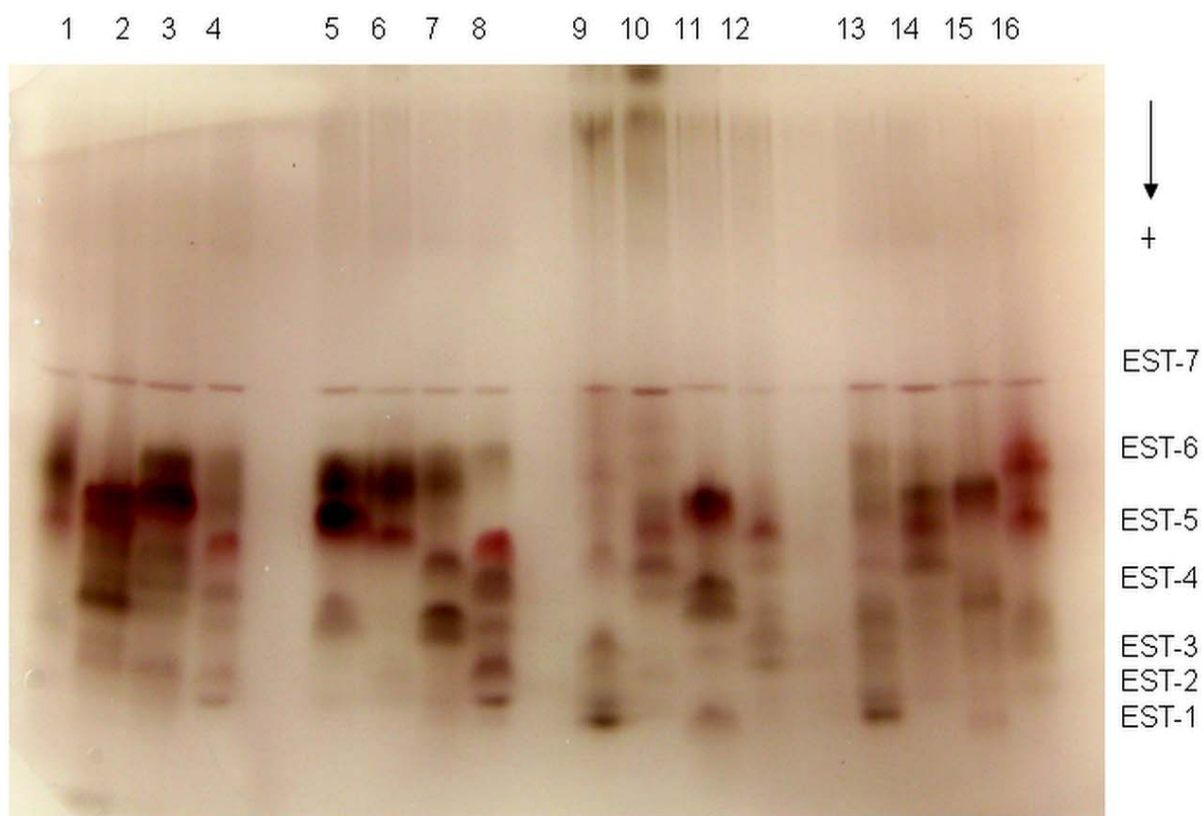


Figura 1 - Perfil eletroforético das esterases em extratos cabeça/tórax de *Migdolus* sp. em gel de poliacrilamida a 7%. 1 a 8 amostras de cabeça/tórax de machos de *Migdolus* sp., 9 a 12 tórax de machos e 13 a 16 cabeças de machos de *Migdolusi* sp.

Nos insetos, as esterases têm sido classificadas em quatro classes baseadas na sensibilidade aos inibidores organofosforados, sulfato de eserina e reagentes sulfidríla. Conforme a classificação proposta por Healy et al. (1991), as carboxilesterases (E.C.3.1.1.1) são inibidas pelos organofosforados, mas são insensíveis ao sulfato de eserina; as colinesterases são sensíveis aos organofosforados e ao sulfato de eserina; as arilesterases (E.C.3.1.1.2) não são inibidas pelos organofosforados, mas são sensíveis aos reagentes sulfidríla, e as acetilesterases (E.C.3.1.1.6) não são inibidas pelos três grupos de inibidores.

As colinesterases podem ser divididas em dois grupos as acetilcolinesterases ou colinesterase tipo I (E.C.3.1.1.7) quando não são inibidas pelo p-CMB, e pseudocolinesterases ou colinesterase tipo II (E.C.3.1.1.8) quando são inibidas pelo p-CMB (Healy et al., 1991).

No presente estudo, extratos de cabeça/tórax de machos de *Migdolus* foram submetidos aos três grupos de inibidores durante a coloração das esterases e permitiu classificar a EST-1 como colinesterase I; a EST-2 e EST-5 como Carboxilesterase; as EST-3, EST-4, EST-6 como acetilesterase e a EST-7 como arilesterase (Quadro 3).

Quadro 3 – Atividade e Classificação das Esterases em *Migdolus* sp. (-) Inibição, (+) Não Inibição

Esterases	Malathion	p-CMB	Sulfato de Eserina	Classificação
EST-1	-	+	-	Colinesterase I
EST-2	-	+	+	Carboxilesterase
EST-3	+	+	+	Acetilesterase
EST-4	+	+	+	Acetilesterase
EST-5	-	+	+	Carboxilesterase
EST-6	+	+	+	Acetilesterase
EST-7	+	-	+	Arilesterase

As carboxilesterases têm um papel importante na detoxificação eficiente de agroquímicos (Wheelock et al. 2008) pela interação com as três principais classes

de agrotóxicos: os organofosforados (Sato and Hosokawa 2000), carbamatos (Gupta e Dettbarn 1993) e piretróides (Casida et al. 1983).

Guedes et al. (1997) demonstraram que a atividade específica de acetilcolinesterase diferiu significativamente entre populações brasileiras resistentes e suscetíveis de *Rhyzopertha dominica* (Fabricius, 1792) (Coleoptera, Bostrichidae) indicando que a atividade aumentada da acetilcolinesterase estaria associada com a resistência a organofosforados.

A importância do estudo da resistência de insetos de produtos armazenados a inseticidas pode ser resumida em dois aspectos: o primeiro refere-se às perdas quantitativas e qualitativas da produção impostas pelo ataque de insetos; o segundo está relacionado com o reduzido número de produtos utilizados no controle desses insetos, sendo que, uma vez estabelecida a resistência, pouco poderá ser feito para realizar um controle efetivo das populações (Ceruti e Lázzari, 2003).

Os resultados mostram (Quadro 3) que as EST-1 (Colinesterases I) e a EST-7 (arilesterase) são duas isoenzimas que poderiam estar associadas à resistência a inseticidas, como, por exemplo, organofosforados e piretróides. Contudo, será necessário desenvolver bioensaios com esses agroquímicos para corroborar ou não com esta hipótese.

As EST-2 e EST-5, duas carboxilesterases, também podem apresentar papel importante na detoxificação de *Migdolus*, contribuindo com a resistência a inseticidas.

Com relação à termoestabilidade foi possível observar que a EST-7 foi a que apresentou maior termoestabilidade, chegando a sofrer inibição apenas aos 65°C. A EST-2 foi a esterase mais sensível, perdendo sua atividade em 52°C. A EST-3, EST-4 e EST-6 começaram a perder a atividade logo em 52°C, entretanto sua inibição total ocorreu em 57°C. A EST-5 também sofreu redução parcial da atividade relativa, sendo inativada em 57°C. A EST-1 não sofreu inibição parcial da atividade, perdendo sua atividade em 57°C, conforme Quadro 4. Estes dados demonstram que a esterase mais sensível a temperaturas é a EST-2 e a menos sensível a EST-7.

As esterases que apresentam maior resistência a temperatura podem contribuir com a resistência a alguns tipos de inseticidas, como por exemplo, piretróides. A toxicidade desses agroquímicos está associada à temperatura (Wheelock et al. 2008). Os piretróides têm demonstrado que sua toxicidade

aumenta com a diminuição da temperatura em vários graus dependendo da espécie e do piretróide empregado (Wheelock et al. 2008). Esterases que apresentem maior termoestabilidade contribuem para aumentar a resistência do inseto a esses agroquímicos.

Quadro 4 – Alteração na Atividade das Esterases em *Migdolus* sp. após aquecimento. +/- = redução parcial da atividade relativa; -= sem atividade, += atividade normal

Temperatura	52°C	55 °C	57 °C	60 °C	65 °C
EST-1	+	+	-	-	-
EST-2	-	-	-	-	-
EST-3	+/-	+/-	-	-	-
EST-4	+/-	+/-	-	-	-
EST-5	+/-	+/-	+/-	-	-
EST-6	+/-	+/-	-	-	-
EST-7	+	+	+	+	-

O número de proteínas solúveis detectados pela técnica de SDS/PAGE foi diferente em machos e fêmeas (Figura 2). Os extratos de cabeça/tórax de machos apresentaram maior número de peptídeos que os extratos de fêmeas. Somente nos extratos de macho foram observados peptídeos entre 90 e 220 KDa (Figura 2). A diferença no número de peptídeos pode estar associada às diferenças fisiológicas e comportamentais dos dois sexos, já que os machos são alados e as fêmeas não voam. Outra diferença seria o fato das fêmeas liberarem feromônios de atração para os machos.

De acordo com alguns estudos, o tórax é a região da fêmea que pode estar relacionada com a produção do feromônio sexual. Bento et al. (1992) identificaram que o tórax da fêmea foi a parte do corpo que mais atraiu os machos em armadilhas. Bento et al. (1993) explica ainda que o tórax está relacionado a produção do feromônio desses insetos devido a uma maior exposição de cutícula dura. Neste caso, os machos necessitam identificar o local onde as fêmeas estão localizadas

para o acasalamento. Assim, essas proteínas ainda não identificadas poderiam ter papel no processo reprodutivo desses insetos.

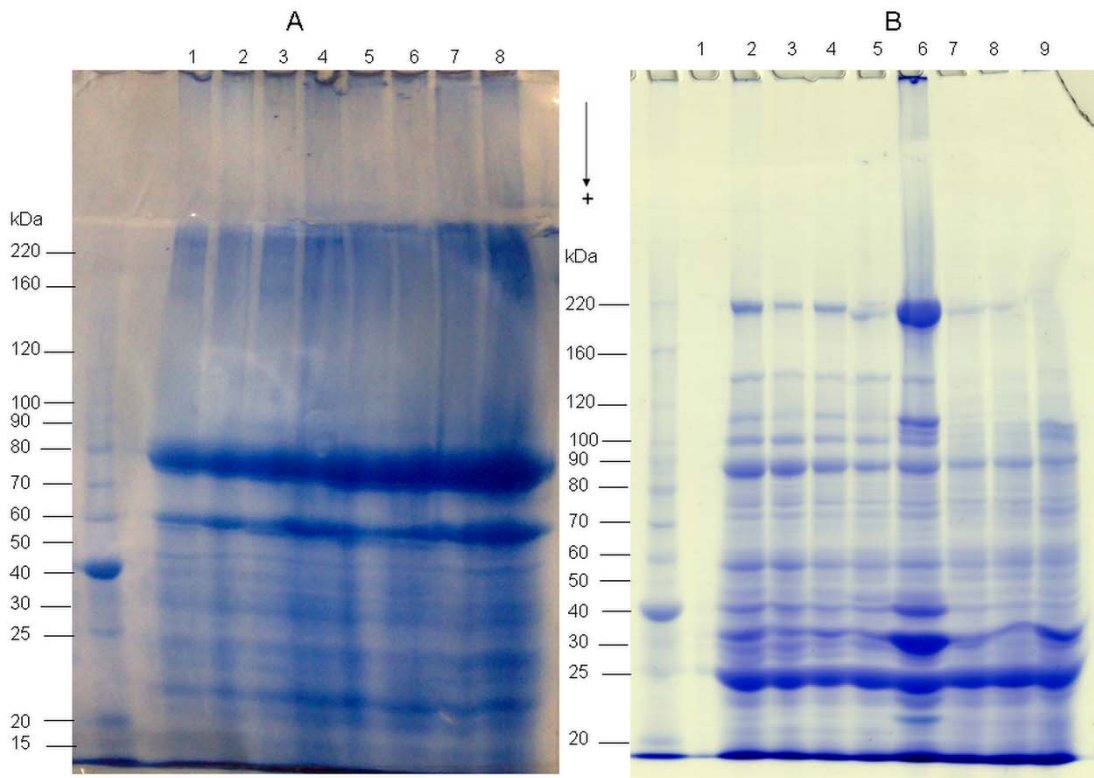


Figura 2 - Perfil eletroforético da Proteína Total de extratos cabeça/tórax de *Migdolus* sp. em gel de poliacrilamida a 7%. A = Extratos de cabeça/tórax de fêmeas de *Migdolus* sp. B = Extratos de cabeça/tórax de machos de *Migdolus* sp.

Essa diferença de peptídeos necessita de estudos futuros. Será necessário desenvolver métodos para criação de *Migdolus* em laboratório para o entendimento do seu ciclo de vida completo. Além disso, o controle da idade dos adultos deverá ser realizado para identificar se há diferença na expressão de proteínas ao longo do desenvolvimento, na maturação sexual e reprodução. A identificação desses peptídeos poderá contribuir com o desenvolvimento de métodos mais eficazes para o seu manejo e controle, uma vez que alguns métodos de controle são baseados em formas sintéticas do feromônio liberado pela fêmea para atração do macho.

4. CONCLUSÕES

Na população em estudo, *Migdolus* sp apresentou sete esterases, sendo que a EST-1 é uma colinesterase I, EST-2 e EST-5 são carboxilesterase e a EST-7 uma arilesterase. As EST-1 e EST-7 apresentaram as maiores termoestabilidades. Dessa maneira, as isoenzimas EST-1, EST-2, EST-5 e EST-7 poderão se tornar marcadores em estudos sobre a resistência a inseticidas.

Os machos apresentaram maior número de peptídeos que as fêmeas nas análises SDS-PAGE, que podem estar relacionados com a reprodução desses insetos. Será importante desenvolver novos estudos sobre a biologia de *Migdolus*, priorizando a fisiologia e comportamentos reprodutivos para associar essas proteínas com o dimorfismo entre os sexos.

As isoenzimas esterases e as proteínas solúveis mostraram um bom potencial para o melhor entendimento da biologia dessa praga e para o desenvolvimento de métodos de controle.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRIDGE, W.N. Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thophosphate (E605) and analogues. **Biochemical**, 46:451-460, 1950.

ARRIGONI, E.B. Biologia de *Migdolus fryanus* Westwood, 1863, em condições controladas: danos preliminares. **Boletim Técnico Copersucar**, 40:24-28, 1988a.

BENTO, J.M.S.; ALBINO F.E.; DELLA LÚCIA T.M.C.; VILELA, E.F. Field trapping of *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Cerambycidae) using natural sex pheromone. **Journal of Chemical Ecology**, 18:245-251, 1992.

BENTO, J.M.S.; VILELA, E.F.; DELLA LÚCIA, T.M.C.; LEAL, W.S.; NOVARETTI, W.E.T. ***Migdolus***: biologia, comportamento e controle. Salvador: 1995. 58p.

BENTO, J.M.S.; LUCIA, T.M.C.D.; VILELA, E.F.; ARRIGONI, E.B.; LEAL, W.S. ***Migdolus***. In: SALVADORI, J.R. Pragas do solo o Brasil. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2004, 544p.

CASIDA, J.E.; GAMMON, D.W.; GLICKMAN, A.H.; LAWRENCE, L.J. Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 23:413-438, 1983.

CARVALHO, V.M.; MARQUES, R.M. LAPENTA, A.S.; MACHADO, M.F.P.S. Functional classification of esterases from leaves of *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (Apocynaceae). **Genetics and Molecular Biology**, 26:51-59, 2003.

CERON, C.R.; SANTOS, J.R.; CAMPOS BICUDO, H.E.M.C. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop. **Brazilian Journal of Genetics**, 15:201-203, 1992.

CERUTI, C.C.; LÁZZARI, S.M.N. Utilização de bioensaios e marcadores moleculares para detecção da resistência de coleópteros de produtos armazenados a inseticidas. **Revista Brasileira de Entomologia**, 47:447-453, 2003.

GUEDES, R.N.C.S.; KAMBHAMPATI, B.A.; DOVER, K.Y. ZHU. 1997. Biochemical mechanisms of organophosphate resistance in *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) populations from the United State and Brazil. **Bulletin of Entomological Research**, 87:581-586, 1997.

GUIMARÃES, L.T.; TURETTA, A.P.D.; COUTINHO, H.L. Uma proposta para avaliar a sustentabilidade da expansão do cultivo da cana-de-açúcar no estado do Mato Grosso do Sul. **Sociedade e Natureza**, 22:313-327, 2010.

GUPTA, R.C.; DETTBARN, W.D. Role of carboxylesterases in the prevention and potentiation of N-methylcarbamate toxicity. **Chem-Biol Interact**, 87:295–303, 1993.

HEALY, M.J.; DUMANCIC, M.M.; OAKESHOTT, J.G. Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*. **Biochemical Genetics**, 29:365-388, 1991.

KAPIN, M.A.; AHMAD, S. Esterases in larval tissue of gypsy moth *Lymantria dispar* L. Optimum assay conditions, qualification and Characterization. **Insect Biochemical**, 10:331-337, 1980.

LOPES, D.A. **Marcadores moleculares aplicados à análise da contaminação com agrotóxicos e à genética de populações da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera; Crambidae)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2009. 82p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento).

MACHADO; L.A.; HABIBI. M.; LEITE, L.G.; CARREGARI, L.C. Aspectos biológicos e morfológicos de *Migdolus fryanus* (Wesstwood, 1983) (Coleóptera: Vesperidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, 73:447-454, 2006.

OAKESHOTT, J.G.; VAN PAPERREC1HT, E.A.; BOYCE, T.M.; HEALY, M.J.; RUSSELL, R.J. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. **Genética**, 90:239–268, 1993.

PEDROSO, R.B.; MARINELLI, S.A.C.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; TOLEDO, J.O.A; TOLEDO, V.A.A. Atividade das esterases em larvas de *B. mori* L.. In: 48

CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA. Águas de Lindóia, 2002. **Resumos...**
SBG: Águas de Lindóia: 2002, p. 146.

RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; LAMA, M.A.D.; SOARES, A.E.E. Esterase-2 polymorphism in *Apis Mellifera*. **Journal of Apicultural Reserach**, 37:17-27, 1998.

RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; MACHADO, M.F.P.S.; CONTE. H. Esterase-3 polymorphism in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae). **Genetics and Molecular Biology**, 25:61-64, 2002.

SATOH. T.; HOSOKAWA, M. Organophosphates and their impact on the global environment. **Neurotoxicology**, 21:223–227, 2000.

SATOLO, L.F.; BACCHI, M.R.P. Dinâmica econômica das flutuações na Produção de cana-de-açúcar. **Economia Aplicada**, 13:377-397, 2009.

SILVA, G.A.R; LAPENTA, A.S. Genetic variability in esterases and the insecticide resistance in brazilian strains of *Oryzaephilus mercator* and *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae). **Bulletin of Entomological Research**, 100:1-9, 2010.

SIQUIEROLI, A.C.S.; BAFFI, M.A.; VIEIRA, C.U.; CÔBO, J.A.; BORGES, A.L.; LUCAS, M.B.; BONETTI, A.M. Atividade esterásica em populações de *Leucoptera coffeella*. **Arquivos do Instituto Biológico**, 71:1-749, 2004.

SMALL, G.J.; HEMINGWAY, J. Differential glycosylation produces heterogeneity in elevated esterases associated with insecticide resistance in the brown planthooper *Nilaparvata lugens*. **Biochemistry and Molecular Biology**, 30:443-453, 2000.

STUCHI, A.L.P.B. **Toxidade e expressão gênica em abelhas do gênero Tetragonisca após a contaminação com agrotóxicos**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2009. 120p. Tese (Doutorado em Zootecnia).

TAVARES, M.G.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; CERON, C.R. Tissue-specific expression of esterases in *Triatoma infestans* (Triatominae, Heteroptera). **Genetics and Molecular Biology**, 21:67-79 1998.

WHEELLOCK, C.E.; PHILLIPS, B.M.; ANDRESON, B.S.; MILER, J.L. MILLER, M.J.; HAMMOCK, B.D. Applications of Carboxylesterase Activity in Environmental Monitoring and Toxicity Identification Evaluations (TIEs). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, 5:117-178, 2008.

CAPÍTULO II

Padronização para análise com marcadores RAPD em *Migdolus* sp.

RESUMO

O conhecimento do nível de variação genética e da sua distribuição entre e dentro de populações é importante para o controle de insetos. Assim, a técnica de RAPD vem sendo utilizada para analisar a variabilidade genética de populações de insetos que poderão ser utilizadas em programas de controle. O coleoptera vesperidae *Migdolus* se tornou praga na cultura de cana-de-açúcar, implicando em dificuldades para o manejo e controle, em razão da falta de informação acerca de sua biologia e estruturação de populações. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo padronizar a técnica de RAPD para *Migdolus* sp. Para a extração do DNA foram utilizados tórax de adultos de *Migdolus* sp. coletados na cidade de Umuarama - Paraná. O protocolo escolhido permitiu obter a extração de qualidade para reação PCR, com uma quantidade que variou de 20 a 80 ng/μL. A melhor quantidade de DNA e MgCl₂ foi de 30 ng e 2,0 mM respectivamente. Dos 83 primers testados, 18 (OPA-02, OPA-04, OPA-08, OPB-01, OPB-07, OPB-10, OPB-11, OPB-13, OPC-01, OPC-02, OPC-05, OPC-09, OPC-12, OPC-16, OPC-18, OPC-19, OPF-13 e OPP-08) apresentaram maior reprodutibilidade, qualidade e quantidade de fragmentos. Os testes realizados contribuíram para a obtenção de resultados significativos na padronização da técnica de RAPD para *Migdolus* sp., podendo a técnica ser utilizada para análises de genética de população e resistência a inseticidas, contribuindo, assim, para programas de controle desta praga.

Palavras-chave: isolamento de DNA, PCR, marcador molecular, metodologia.

Standardization for the analysis with RAPD markers in *Migdolus* sp.

ABSTRACT

The knowledge the level of genetic variation and its distribution among and within populations is crucial for insect control. Thus, RAPD technique has been used to analyze the genetic variability of insects populations that will be used in control programs. The Coleoptera Vesperidae *Migdolus* became pests in the cultivation of sugar cane, resulting in difficulties for the management and control, due to the lack of information about its biology and population structuring. Accordingly, the present study aimed to standardize the technique of RAPD for *Migdolus* sp. It was used the thorax of adult *Migdolus* sp. collected in Umuarama - Paraná. The developed protocol has enabled the extraction of quality for PCR reaction with an amount ranging from 20 to 80 ng / mL. The optimal amount of DNA and MgCl₂ was corresponded to 30 ng and 2.0 mM respectively. From the 83 tested primers, 18 primers (OPA-02, OPA-04, OPA-08, OPB-01, OPB-07, OPB-10, OPB-11, OPB-13, OPC-01, OPC-02, OPC- 05, OPC-09, OPC-12, OPC-16, OPC-18, OPC-19 and OPF-13, OPP-08) had higher reliability, quality and quantity of fragments. The tests helped to achieve significant results in the standardization of RAPD technique for *Migdolus* sp. And may be used for analysis of population genetics and insecticide resistance, thus contributing to programs to control this pest.

Key words: DNA isolation, PCR, molecular marker, methodology.

1. INTRODUÇÃO

Migdolus sp. é um coleóptero polífago, nativo da América do Sul presente em diversas culturas de importância econômica, como o eucalipto, a videira, a amoreira, o algodão, o feijão, o café, a mandioca e pastagens, constituindo-se em uma das principais pragas da cultura da cana-de-açúcar (Machado et al., 2003).

Os insetos do gênero *Migdolus* são de difícil controle, sobretudo, por atingirem grandes profundidades no solo e possuírem um grande número de hospedeiros. Sob condições favoráveis, podem reduzir drasticamente a produtividade, podendo provocar a morte de plantas, causando enormes prejuízos (Salvadori, 2004).

Devido à pouca informação sobre esta praga, os níveis de controle não estão totalmente estabelecidos. Isso tem propiciado estudos relativos aos controles por comportamento, químico, cultural, mecânico e biológico (Nakano et al., 2001). Não há estudos relacionados à genética do *Migdolus* para seu controle. Desta forma, faz-se necessária a padronização de marcadores moleculares para o melhor entendimento da genética do inseto, visando contribuições para o seu manejo.

A importância do conhecimento da variabilidade genética para os programas de manejo e controle de pragas tem sido discutida por décadas, mas essas pesquisas foram facilitadas com o desenvolvimento de marcadores baseados na análise de DNA. A aplicação desses marcadores é uma importante ferramenta para a análise da dinâmica e dos respectivos fatores que influenciam populações naturais (Smith e Wayne, 1996).

A análise da variação genética por meio de técnicas moleculares é uma importante ferramenta para estudos de população, taxonomia, genética e evolução (Reineke et al., 1998).

A caracterização genética das espécies pode ser utilizada para aumentar a eficiência dos programas de controle, pois a identificação do fluxo gênico é um componente essencial para as estratégias de manejo da evolução da resistência (Machado e Fiúza, 2010). As migrações têm um efeito evolutivo porque são capazes de promover alterações das frequências gênicas tanto nas populações da qual se originaram os imigrantes, quanto naquelas que os recebem (Beiguelman, 2008).

A técnica de RAPD vem sendo utilizada para responder a questões relacionadas à genética de populações, bem como para o entendimento da dispersão de espécies de relevância econômica, contribuindo para a produção de marcadores moleculares capazes de identificar indivíduos e, conseqüentemente, populações mais resistentes aos inseticidas (Castiglioni e Bicudo, 2003).

Não existem estudos relacionados à análise genética de *Migdolus*, desta forma, a padronização da técnica de RAPD para *Migdolus* sp. é importante para a caracterização genética destes insetos, inclusive, para programas de controle da praga em diferentes culturas por eles agredidas.

O presente estudo, portanto, teve como objetivo padronizar a técnica de RAPD, estabelecendo uma metodologia de análise genotípica para *Migdolus* sp. a ser utilizada em estudos de marcadores moleculares para análise de estrutura de população e, subseqüentemente, em estudos de resistência a inseticidas e manejo, visando contribuir para o controle deste inseto praga.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Coleta das amostras biológicas

Foram coletados adultos de *Migdolus* sp. Para as análises de padronização de extração de DNA foram coletadas amostras de um amoreiral da Bratac de Umuarama, Paraná. As análises de padronização para amplificação foram utilizadas amostras coletadas na Usina de Álcool de Tapejara.

Os machos de *Migdolus* da Usina de Tapejara foram coletados com o auxílio das armadilhas utilizadas no controle com feromônios sintéticos. Os machos do Amoreiral da Bratac de Umuarama foram capturados vivos pelo método de coleta manual, com o auxílio de luvas.

O material coletado foi levado imediatamente para o laboratório e os indivíduos sacrificados por congelamento e estocados a -20°C .

2.2. Isolamento do DNA

O DNA genômico foi extraído de 20 adultos machos de *Migodlus* sp. Somente o tórax dos adultos foi utilizado para evitar que nucleases existentes no trato digestório desses insetos degradassem o DNA das amostras.

Foram realizados testes dos protocolos de extração de Bardakci e Skibinski (1994) e da metodologia descrita por Doyle e Doyle (1990). As metodologias diferem nas concentrações de componentes específicos. Na extração com método Bardakci e Skibinski (1994), foi utilizado o tampão de extração com 50 mM Tris-HCL, pH 8,0, contendo 10% de SDS, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA e 10 mg / mL proteinase K. No método de Doyle e Doyle (1990) utilizou-se do tampão de extração com 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, contendo 2% de CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA e 100 mg / mL proteinase K.

O protocolo adotado na pesquisa foi o de Doyle e Doyle (1990) modificado, por apresentar melhores resultados. Precedendo o processo de extração do DNA, todos os insetos passaram por uma lavagem manual com água destilada. Os tórax foram homogeneizados individualmente em tubos para microcentrífuga de 1,5 mL, contendo 500 μL da solução tampão (Tris-HCl pH 8,0 0,1M; NaCl 1,4M; 2% CTAB e

0,02M EDTA) e 10 µL de proteinase K, permanecendo em banho-maria por duas horas em 65°C. Em seguida, foram centrifugadas em 11751 xg por dez minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e, na sequência, acrescentou-se 500µL de fenol pH 8,0, sendo centrifugado durante 10 minutos em 11751 xg. O sobrenadante desta solução foi transferido para um novo tubo, com a adição de igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1).

Após a homogeneização e centrifugação, a fase superior foi transferida para um novo tubo. O DNA foi precipitado com a adição de 250 µL de isopropanol gelado e incubado em -20°C *overnight*. Após doze horas, o DNA precipitado foi separado por centrifugação a 11751 xg por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1,0 mL de etanol 70% gelado, sendo colocado para secar em temperatura ambiente.

Depois de seco, o DNA foi ressuspendido por duas horas em 70 µL de tampão TE [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA]. O DNA foi tratado com 2 µL de RNase (10 µg/mL, Invitrogen), permanecendo por mais duas horas em temperatura ambiente, antes do armazenamento em -20°C .

Como a PCR é influenciada pela quantidade de DNA, esta deve ser padronizada. Para tanto, a integridade e a quantificação do DNA foram avaliadas em gel de agarose 0,8% com tampão TAE 1X (Tris, Ácido acético, EDTA, pH 8,0). A quantidade de DNA presente em cada amostra foi estimada por meio de comparação com concentrações conhecidas (50, 100, 150 ng) de DNA-padrão phago λ (Invitrogen). Os géis foram corados com banho de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e as bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta. A imagem foi capturada pelo sistema *Ultraviolet Transilluminator High Performance* - Edas 290, utilizando o programa Kodak 1 D Image Analysis 3.5.

2.3. Amplificação do DNA utilizando primers para RAPD, separação e visualização dos produtos amplificados

Para a padronização de amplificação foram utilizadas amostras de DNA extraídas do tórax de dois indivíduos *Migdolus* sp.

Como base para a amplificação, foi utilizado o protocolo original descrito por Williams et al. (1990) com padronizações para as concentrações de alguns dos componentes. Para a padronização da reação foram testadas as concentrações de

DNA mais utilizadas em estudos de Coleoptera (20; 30; 40 e 50 ng), e de MgCl₂ (1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mM).

Para a seleção dos marcadores, foram avaliados 83 primers para RAPD pertencentes a diferentes Kits: A (1-20), B (1-20), C (1-20), F (5, 9, 13), I (5), L (11), M (1-10) e P (2, 4, 7-11 e 17), desenvolvidos pela *Operon Technologies Inc.*, dos quais o primer OPM-07 foi usado para a padronização da concentração de DNA e de MgCl₂, por ter apresentado maior definição dos fragmentos e um grande número de bandas.

A reação em cadeia da polimerase foi realizada sob as seguintes condições: 94 °C por cinco minutos, seguida por 45 ciclos de amplificação (94 °C por 60 s, 35 °C por 60 s, 72 °C por 120 s) em um termociclador (Techne TC 512). Após os 45 ciclos, foi realizada uma extensão final de 7 min a 72 °C.

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1,7% a 60 *volts* usando tampão TBE 0,5X (Tris-borato, EDTA pH 8,0) e corados com banho de brometo de etídio (0,5 µg/mL). Os fragmentos de DNA foram visualizados sob a luz ultravioleta, com a captura da imagem pelo sistema EDAS (Kodak 1 D Image Analysis 3.5).

Um marcador de peso molecular de DNA (DNA Ladder-Invitrogen) foi utilizado para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo Doyle e Doyle (1990) modificado mostrou-se mais adequado para extração de DNA de *Migdolus* sp. A diferença básica entre os métodos utilizados foram as concentrações específicas do tampão de extração. Apesar do protocolo de Bardakci e Skibinski (1994) isolar o DNA, este ainda estava contaminado com proteínas.

A quantificação do DNA genômico extraído de *Migdolus* sp. de cada localidade foi realizada pela comparação visual da intensidade das bandas de DNA do fago λ em gel de agarose. A metodologia utilizada para a extração do DNA possibilitou a realização de uma extração de qualidade para a amplificação e com quantidade variando de 20 a 80 ng/ μ L (Figura 1).

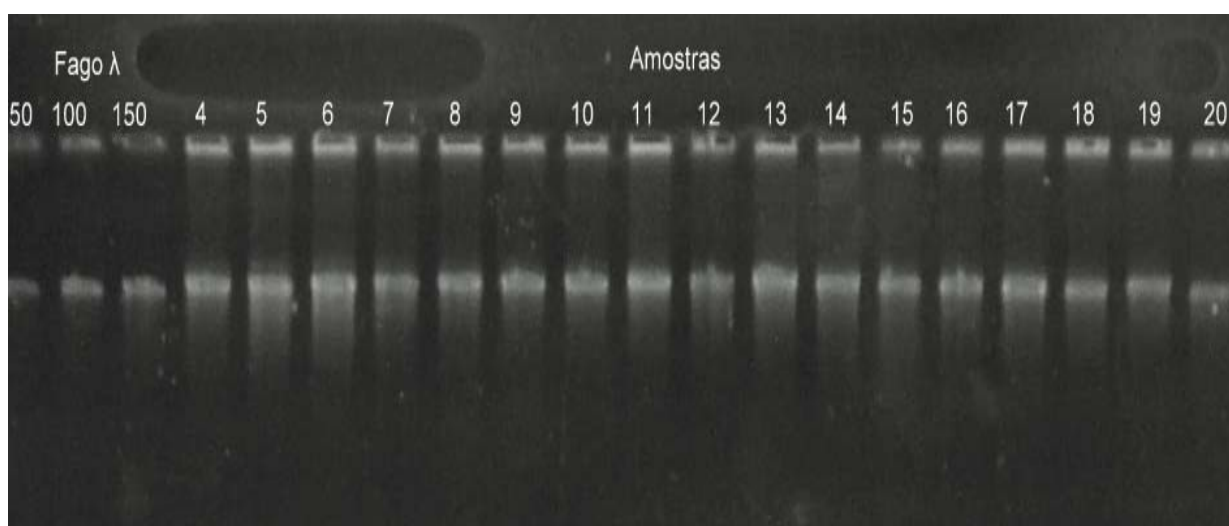


Figura 1 - Gel de Agarose 0,8% utilizado para a quantificação das amostras de DNA de *Migdolus* sp. Amostras 1, 2 e 3 são DNAs de fago λ utilizadas como padrão de concentração com 50, 100, 150 ng, respectivamente. As amostras 4 a 20 são de DNAs de *Migdolus* sp. da população de Umuarama – Paraná.

Para garantir que os resultados fossem reproduzidos, quantidades de DNA e concentrações e de $MgCl_2$ foram testadas. Foi possível verificar que a melhor quantidade de DNA foi de 30 ng, uma vez que quando esta concentração foi utilizada, um maior número de fragmentos amplificados foi obtido (Figura 2). Para o $MgCl_2$, as bandas de DNA nítidas e bem fracionadas foram obtidas quando a concentração de 2,0 mM foi utilizada para a reação (Figura 2).

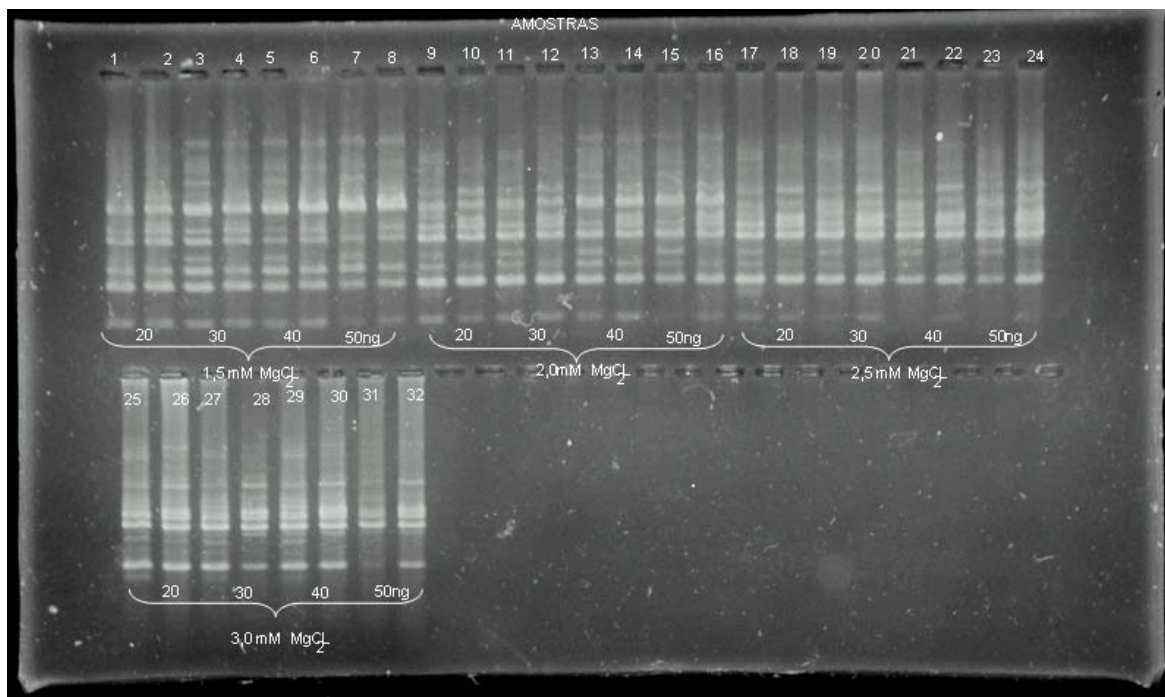


Figura 2 - Gel de agarose a 1,7%, utilizado para separar os fragmentos de DNA amplificados durante a padronização da concentração de DNA e $MgCl_2$, utilizando as duas amostras de Tapejara para todos os testes. Para as amostras de **1 a 8**, foi utilizada uma concentração de 20, 30, 40 e 50 ng de DNA com 1,5 mM de $MgCl_2$; para as amostras de **9 a 16** foram utilizadas as mesmas concentrações de DNA com 2,0 mM de $MgCl_2$; para as amostras de **17 a 24** foram utilizadas as mesmas concentrações de DNA com 2,5 mM de $MgCl_2$; e, para as amostras de **25 a 32** foram utilizadas as mesmas concentrações de DNA com 3,0 mM de $MgCl_2$. Para amplificar as amostras de **1 a 32** utilizou-se o *primer* OPM-07 e duas amostras de DNA escolhidas ao acaso.

A padronização da quantidade de DNA é de grande importância para uma amplificação de qualidade. Carvalho e Vieira (2001) citam que a quantidade de DNA íntegro com relação ao primer é um dos fatores fundamentais para o sucesso da reação de PCR, pois pode não haver ocorrência de amplificação se a sua quantidade for excessivamente baixa ou alta.

A composição do tampão de reação, principalmente no que se refere à concentração de $MgCl_2$, pode afetar os resultados, inclusive, com falhas nas amplificações do DNA (Santos, 2003).

Dos 83 primers testados, 18 deles (OPA-02, OPA-04, OPA-08, OPB-01, OPB-07, OPB-10, OPB-11, OPB-13, OPC-01, OPC-02, OPC-05, OPC-09, OPC-12,

OPC-16, OPC-18, OPC-19 e OPF-13, OPP-08) apresentaram maior reprodutibilidade, qualidade e quantidade de fragmentos.

A origem dos fabricantes de primers não parece se constituir num ponto crítico para a execução da RAPD. Skibsted et al. (1998) demonstraram que, mesmo com o emprego de iniciadores adquiridos de dois fabricantes diferentes, os resultados obtidos na RAPD são idênticos.

O tamanho dos produtos amplificados permaneceu entre 300 e 5000 pb, conforme demonstrado na Figura 3.

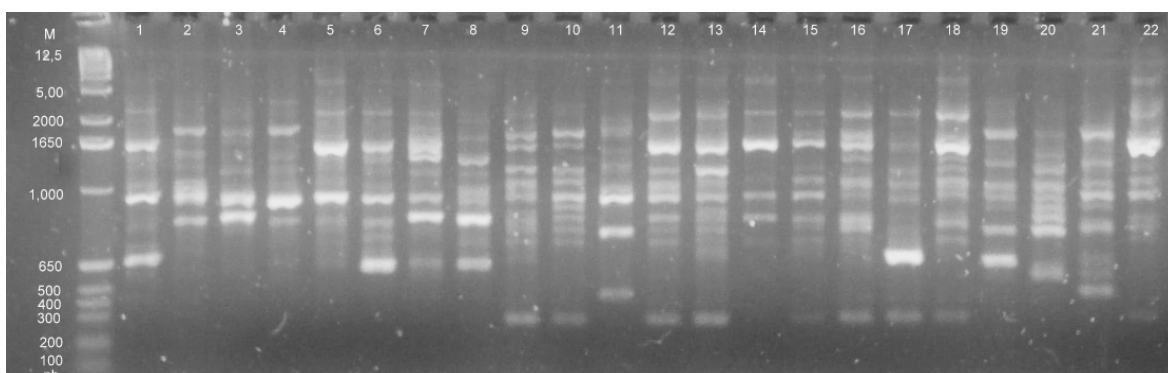


Figura 3 - Perfis eletroforéticos de RAPD de *Migdolus* sp. Fragmentos amplificados com o *primer* OPC-01. Amostras (01 a 22) de Tapejara. M = Marcador de peso molecular de DNA (DNA Ladder-Invitrogen).

Apesar de serem testadas as concentrações de alguns reagentes, é importante que sejam realizados testes com diferentes números de ciclos e temperaturas de anelamento, assim como o tipo do termociclador, pois tais fatores podem influenciar nos resultados da técnica.

4. CONCLUSÃO

A concentração de 30 ng foi a que obteve maior número de fragmentos amplificados.

Para o MgCl₂, a concentração de 2,0 mM foi a que identificou as bandas de DNA nítidas e bem fracionadas.

Os primers (OPA-02, OPA-04, OPA-08, OPB-01, OPB-07, OPB-10, OPB-11, OPB-13, OPC-01, OPC-02, OPC-05, OPC-09, OPC-12, OPC-16, OPC-18, OPC-19 e OPF-13, OPP-08) apresentaram maior reprodutibilidade, qualidade e quantidade de fragmentos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O. Application of the RAPD technique in Tilapia fish: species and subspecies identification. **Heredity**, 73:117-123, 1994.
- CARVALHO, A.O.R.; VIEIRA, L.G.E. Determinação das condições ótimas para análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). Londrina: **Neotropical Entomology**, 4:593-600, 2001.
- CASTIGLIONI, L.; BICUDO, H.E.M.C. Utilização da técnica de RAPD-PCR para estudos em Genética Molecular de insetos. **Revista UNORP**, 3:79-93, 2003.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12:13-15, 1990.
- MACHADO, L.A.; HABIB, M.; LEITE, L.G.; GOULART, R.M.; TAVARES, F.M.C.; ALEGARI, L.C.; LAINETI, D.O. Controle de *Migdolus fryanus* na cultura da cana-de-açúcar com nematóides entomopatogênicos. In: REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO. Catanduva, 2003. **Anais...** Catanduva: SP, 2003. p.70-78.
- MACHADO, V.; FIÚZA, L.M. Evolução e manejo da resistência de insetos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 11:68-74, 2010.
- NAKANO, O.; ROMANO, F.C.B.; PESSINI, M.M.O. **Pragas do solo**. Campinas: ESALQ, 2001. 213p.
- REINEKE, P. KARLOVSKY AND C.P.W. ZEBITZ. Preparation and purification of DNA from insects for AFLP analysis. **Insect Molecular Biology**, 8:95-99, 1998.
- SALVADORI, J.R. **Pragas de solo no Brasil**. Dourados: Embrapa, 2004. 544p.
- SANTOS, L.R. Padronização da RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) para caracterização molecular de *Salmonella enteritidis*. **Revista da FZVA** 10:144-158, 2003.

SKIBSTED, U.; BAGGESEN, D.L.; DESSAU, R.; LISBY, G. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and phage-typing in the analysis of a hospital outbreak of Salmonella Enteritidis. **Journal of Hospital Infection**, 38:207-216, 1998.

SMITH, T.B.E WAYNE, R.K. **Molecular genetic aproaches in conservation**. New York: Oxford University Press, 1996, 483p.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleics Acids Research**, 18:6531-6535, 1990.

CAPÍTULO III

Genética de populações de *Migdolus* sp.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo analisar a variabilidade genética em *Migdolus* sp. utilizando marcadores RAPD para entender a estrutura de populações desses insetos no noroeste do Paraná. Foram analisados DNA isolados de tórax de 15 *Migdolus* sp. coletados nas cidades de Umuarama, Tapejara, Cidade Gaúcha e Colorado – Paraná, totalizando 60 indivíduos. Para tal, foram utilizados 16 primers que geraram 247 fragmentos, dos quais 244 foram polimórficos (98,79%). A estimativa da diversidade genética pelo índice de Shannon revelou um valor de 0,4853 com desvio padrão de ($\pm 0,1861$). O valor G_{ST} obtido foi de 0,3355, indicando que as populações estão diferenciadas. As quatro populações analisadas foram subdivididas em dois grandes grupos, onde as populações de Cidade Gaúcha e Colorado permaneceram agrupadas. As populações de Umuarama e Tapejara foram agrupadas em outro grupo. A maior distância genética foi estimada entre a população de Umuarama e Cidade Gaúcha. As populações que apresentaram menores distâncias genéticas foram as de Cidade Gaúcha e Colorado. Contudo, estas populações estão geograficamente distantes (157 Km), podendo apresentar uma base de variabilidade genética ancestral. Assim, os dados demonstram que estas populações não possuem barreiras para o cruzamento entre os reprodutores. Portanto, devido ao elevado polimorfismo e à estrutura de populações observada, essa espécie de besouro está bem adaptada à região, sendo necessário o desenvolvimento de programas de controle dessa praga.

Palavras-chave: Polimorfismo; RAPD; marcador molecular, variabilidade genética

Population genetics of *Migdolus* sp.

ABSTRACT

This study aimed to analyze the genetic variability in *Migdolus* sp. by RAPD to understand the structure of populations of these insects in northwestern Paraná. We have analyzed thorax's 15 *Migdolus* sp. in the cities Umuarama, Tapejara, Cidade Gaucha and Colorado - Paraná, totaling 60 individuals. To this end, we used 16 primers that generated 247 fragments, of which 244 were polymorphic (98.79%). The estimation of genetic diversity by the Shannon index revealed a value of 0.4853 with standard deviation of ($\pm 0, 1861$). The G_{ST} value obtained was 0.3355, indicating that populations are differentiated. The four populations analyzed can be divided into two major groups, where the population of Cidade Gaucha and Colorado are remained grouped and the populations of Umuarama and Tapejara are in another group. The greatest genetic distance was estimated between the population of Umuarama and Cidade Gaúcha. The populations that showed the smallest genetic distances were Cidade Gaucha and Colorado. However, these populations are geographically distant (97.55980 miles), which have a base of genetic variability ancestor. Thus the data show that these populations have no barriers to cross through reproducers. Therefore, due to the high polymorphism and population structure observed, this species of beetle is well adapted to the region, necessitating the development of programs to control this pest.

Key words: Genetic polymorphism, RAPD, molecular marker, genetic variability.

1. INTRODUÇÃO

As larvas de *Migdolus* sp. trazem implicações negativas para os canaviais. Os ataques aparecem em áreas bem delimitadas da cultura (reboleiras, manchas). Na cana planta, as larvas iniciam o ataque nos toletes prejudicando, inicialmente, o brotamento das gemas e, posteriormente, a destruição, em tempo relativamente curto, das touceiras até a altura do colo da planta, ocasionando a morte das mesmas e, conseqüentemente, intensivas falhas na cultura. A partir do primeiro corte, as canas ficam com o desenvolvimento paralisado, secando toda a parte aérea, deixando o sistema radicular completamente destruído. Assim sendo, são facilmente tombadas por correntes de ventos e, em canavial de colheita mecanizada, podem até mesmo serem arrancadas pela colheitadeira. Outro aspecto importante é que o ataque intensivo das larvas se dá nos meses de inverno, quando são registradas poucas chuvas, afetando ainda mais o desenvolvimento das plantas (Machado et al., 2003).

As larvas de *Migdolus* sp. se alimentam e destróem o sistema radicular das plantas em qualquer idade. Com isso, pode haver uma grande redução na absorção de água e nutrientes pelas plantas, levando-as ao secamento e à morte (Bento et al., 2004).

As perdas provocadas por esse inseto podem variar de 25 a 30 toneladas de cana por hectare. Na maioria dos casos, resulta na completa destruição da lavoura, levando à reforma antecipada mesmo de canaviais de primeiro corte (Machado et al., 2003).

Além da cana-de-açúcar, outras culturas são atacadas pelo *Migdolus fryanus*. Há registros de ataques de mudas de plantios de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (Sénéé) Barr. e Golf. Essa plantação tem sido observada no estado de São Paulo, completando a relação de culturas econômicas atacadas por este besouro (Wilcken et al., 2005).

A primeira referência sobre o gênero *Migdolus* data de 1863, ano de sua descrição por Westwood. O besouro parece ter origem na região Centro Sul da América do Sul, (Bento et al., 1992; Bento et al., 1995) e sua constatação na cultura da cana data-se desde 1927 (Bento et al., 1995). Acredita-se que a introdução do

Migdolus em monoculturas ocorreu devido à derrubada de plantas nativas do cerrado.

Pela biologia e pelo comportamento, nota-se que *Migdolus fryanus* é um inseto de difícil controle. Além disso, é quase impossível uma previsibilidade exata dos talhões onde o inseto irá aparecer em cada ano. Com isso, faz-se necessário o emprego de medidas de controle basicamente por toda área de plantio da cultura da cana-de-açúcar (Machado e Habib, 2006).

O controle mais freqüente de *Migdolus* é a utilização de inseticidas, entretanto, não é suficiente para eliminação deste inseto praga em culturas de interesse econômico. Muitas vezes deve ser empregado com outros métodos de controle, como o uso de feromônio sintético ou prática mecânica e cultural, aumentando o custo da produção.

A caracterização de variações genéticas em populações naturais de inseto-praga é considerada importante. Entretanto, até o momento não há dados disponíveis sobre a estrutura genética de populações de *Migdolus*. O desenvolvimento de estudos sobre a variabilidade desses insetos é necessário para os programas de controle dos mesmos. De tal modo, com a análise pelo marcador molecular RAPD, é possível compreender a genética de populações desses insetos, com o aprofundamento de conhecimentos a respeito da dinâmica populacional em geral, bem como entre as relações genéticas das populações, contribuindo para o entendimento do desenvolvimento e controle eficiente desses insetos-praga. Considerando que estudos demonstram que coleópteras em geral apresentam alto polimorfismo genético, provavelmente, tal fator contribuirá para a avaliação da estrutura de populações dos *Migdolus*.

Com esse propósito, a presente pesquisa teve como objetivo analisar a estrutura de populações de *Migdolus* sp. distribuídas na região noroeste do Paraná-Brasil, por meio do marcador RAPD.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Coleta das amostras biológicas

Adultos de *Migdolus* sp. foram coletados em quatro regiões diferentes do estado do Paraná, pertencentes a canaviais de três usinas e um amoreiral da empresa Bratac, conforme Quadro 1 e Figura 1.

Quadro 1 - Identificação das populações de *Migdolus* sp., local de coleta das amostras

Populações	Empresa/Usinas	Coordenadas geográficas	Cidade	Estado
Pop1	Bratac	23°47'55"S 53°18'48"O	Umuarama	Paraná
Pop2	Usaciga	23°22'28"S 52°56'56"O	Cidade Gaúcha	Paraná
Pop3	Santa Terezinha	23°43'59"S 52°52'24"O	Tapejara	Paraná
Pop4	Alto Alegre	22°30'06"S 51°58'05"O	Colorado	Paraná



Figura 1 - Mapa dos estados do Paraná, identificando os locais de coleta de *Migdolus* sp.

Adultos de *Migdolus* do Amoreiral da Bratac de Umuarama foram coletados vibros, manualmente e com o auxílio de luvas pelo método de coleta manual. As populações das três Usinas de Álcool (Tapejara, Cidade Gaúcha e Colorado) foram

coletadas com o auxílio das armadilhas utilizadas no controle com feromônios sintéticos.

Após a coleta, os insetos foram sacrificados por congelamento, acondicionados em sacos plásticos, identificados e armazenados em caixa de isopor contendo gelo. Posteriormente, foram levados ao laboratório de Eletroforese e Genética Animal (UEM) e estocadas a -20°C para as análises laboratoriais.

2.2. Isolamento do DNA

O DNA total foi extraído de 20 adultos de *Migodlus* sp. de cada localidade, totalizando 80 indivíduos. Somente o tórax dos adultos foi utilizado para evitar que nucleases existentes no trato digestório desses insetos degradassem o DNA das amostras.

O protocolo de extração adotado na pesquisa foi o de Doyle e Doyle (1990) modificado. Os tórax foram homogeneizados em tubos para microcentrifuga de 1,5 ml, contendo 500 μL do tampão de extração [0,1M Tris-HCl (pH 8,0), 1,4M NaCl; 2% CTAB e 0,02M EDTA e 10 μL de Proteinase K]. Após duas horas de incubação a 65°C , o material foi centrifugado durante dez min (11751 xg) e o sobrenadante transferido para um novo tubo, adicionando-se 500 μL de fenol pH 8,0 e foi centrifugado novamente por dez minutos (11751 xg). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionando-se igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização e centrifugação para separação das fases, a fase superior foi transferida para um novo tubo. O DNA foi precipitado com a adição de 250 μL de isopropanol gelado e incubado a -20°C *overnight*. O DNA precipitado foi separado por centrifugação a 11751 xg por 10 min. Após descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado com 1,0 mL de etanol 70% gelado e deixado secar à temperatura ambiente. Depois de seco, o DNA foi ressuspenso por duas horas em 70 μL de tampão TE (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA), tratado com RNase (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e permanecendo por mais duas horas na bancada antes de ser armazenado a -20°C .

A integridade e a quantificação do DNA foram avaliadas em gel de agarose 0,8% com tampão TAE 1X (Tris, Ácido acético, EDTA, pH 8,0). A quantidade de DNA presente em cada amostra foi estimada por meio de comparação com

concentrações conhecidas e graduadas de DNA-padrão (phago λ). Os géis foram corados com banho de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/mL}$) e as bandas de DNA visualizadas sob luz ultravioleta e a imagem capturada por sistema da EDAS (Kodak 1 D Image Analysis 3.5).

2.3. Amplificação do DNA utilizando primers para RAPD, separação e visualização dos produtos de amplificação

As reações de amplificação foram realizadas com DNA extraído do tórax de *Migdolus* sp. Para tanto, foram selecionadas 15 amostras de cada localidade, totalizando 60 amostras.

Para a amplificação, foi utilizado o protocolo original descrito por Williams et al. (1990) adaptado. As reações de amplificação para os ensaios de RAPD foram realizadas em um termociclador “Eppendorf Mastercycler® Gradient” e as concentrações dos reagentes que apresentaram melhor reprodutibilidade e qualidade utilizadas para as reações de amplificação, encontram-se descritas no Quadro 2.

Quadro 2 - Concentrações dos reagentes estoques e concentrações finais utilizadas nas reações de amplificação do DNA das diferentes populações de *Migdolus* sp.

Reagentes	Concentração Estoque dos Reagentes	Concentração Final dos Reagentes/reação	$\mu\text{L}/20\mu\text{L}$ de reação
H2O			11,6
Tampão	10 X	1 X	2,0
MgCl ₂	25 mM	2,0 mM	1,6
DNTPs	2,5 mM/cada	0,1 mM/cada	0,8
Primer	10 μM	0,45 μM	0,6
Taq-DNA	5 U/ μL	1 U	0,2
DNA	10 ng/ μL	30ng	3,0
Total			2,0

Para avaliar o genoma das populações foram selecionados 16 primers (OPA-02, OPA-04, OPA-08, OPB-01, OPB-07, OPB-10, OPB-11, OPB-13, OPC-01, OPC-05, OPC-09, OPC-12, OPC-16, OPC-18, OPC-19 e OPF-13), dos 83 *primers*

de RAPD testados pertencentes a diferentes Kits, desenvolvidos pela *Operon Technologies Inc.*,

2.4 Análises dos dados

As análises dos dados moleculares envolveram a interpretação dos fragmentos (bandas) de DNA genômico obtidos nos experimentos. Verificou-se que cada indivíduo produziu um perfil eletroforético com determinado *primer*, ou seja, foi detectada a presença (1) ou ausência (0) de bandas no gel, que correspondem aos fragmentos de locos RAPD específicos. Os resultados foram organizados em matrizes de dados binários. Em uma matriz, para cada indivíduo, constatou-se a presença ou ausência da banda correspondente a cada um dos locos estudados.

A variabilidade genética, dentro e entre as populações, foi determinada pela porcentagem de locos polimórficos. A diversidade genética das populações analisadas foi calculada pelo índice de Shannon (I) (Lewontin, 1972). Também foram calculados os valores de G_{ST} . Para o cálculo dessas análises foi utilizado o programa Popgene 1.31 (Yeh et al., 1999).

A matriz de similaridade foi submetida a uma análise de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*), para construção de um dendrograma, a fim de representar graficamente a distância genética das populações analisadas. Para esta análise foi utilizado o programa NTSYS 1.7, *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* (Rohlf, 1989), baseado no complemento aritmético do coeficiente de Jaccard e o programa Popgene 1.31 (Yeh et al., 1999), fundamentado no complemento aritmético da distância genética de Nei (1978)..

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de fragmentos nítidos e reproduzíveis gerados por primers em todas as populações analisadas apresentou variações de 12 a 21 fragmentos, sendo o primer OPC-01 o que revelou maior número de bandas (21 fragmentos). Dentre os primers que apresentaram menor número encontram-se OPA-04; OPB-10 e OPB-13 com 12 fragmentos amplificados (Quadro 3).

Os primers utilizados amplificaram um total de 247 bandas, com uma média de 15,43 bandas por primer. Do total, 244 foram polimórficas, correspondendo a uma média de 18,76 bandas polimórficas por primer; e um total de 98,79% de polimorfismo (Quadro 3).

Quadro 3 - Primers, seqüências de nucleotídeos, número de fragmentos por *primer* e número de fragmentos polimórficos, amplificados pela reação RAPD em populações de *Migdolus* sp.

Primer	Seqüências de nucleotídeos	Número de fragmentos	Número de fragmentos polimórficos
OPA - 02	5' - TGCCGAGCTG - 3'	13	13
OPA - 04	5' - AATCGGGCTG - 3'	12	09
OPA - 08	5' - GTGACGTAGG - 3'	18	18
OPB - 01	5' - GTTTCGCTCC - 3'	18	18
OPB - 07	5' - GGTGACGCAG - 3'	16	16
OPB - 10	5' - CTGCTGGGAC - 3'	12	12
OPB - 11	5' - GTAGACCCGT - 3'	17	17
OPB - 13	5' - TTCCCCCGCT - 3'	12	12
OPC - 01	5' - TTCGAGCCAG - 3'	21	21
OPC - 05	5' - GATGACCGCC - 3'	13	13
OPC - 09	5' - CTCACCGTCC - 3'	14	14
OPC - 12	5' - TGTCATCCCC - 3'	15	15
OPC - 16	5' - CCACTCCAG - 3'	18	18
OPC - 18	5' - TGAGTGGGTG - 3'	15	15
OPC - 19	5' - GTTGCCAGCC - 3'	17	17
OPF - 13	5' - GGCTGCAGAA - 3'	16	16
Total		247	244

Não existem estudos sobre a diversidade genética em *Migdolus* sp. Entretanto, quando nossos resultados são comparados com outras pesquisas relacionadas à diversidade genética em Coleópteros, observa-se que o gênero *Migdolus* apresenta maior variabilidade genética.

Estudos de polimorfismo genético de besouros *Leptinotarsa decemlineata* demonstraram 50% de polimorfismos de RAPD nas amostras estudadas (Sidorenko e Berezovskaya, 2001). Pesquisas realizadas por Kim e Sappington (2004) com marcadores RAPD, analisando a estrutura genética de *Anthonomus grandis*, mostraram 36 a 64% de locos polimórficos. Martins et al. (2007) identificaram polimorfismo entre 52 a 84% em *Anthonomus grandis* (Coleoptera) por meio de análise de RAPD.

O número e a proporção de fragmentos polimórficos detectados nas quatro populações de *Migdolus* sp. analisadas estão apresentados no Quadro 4. Na população de Colorado (PR) foi identificada a maior proporção de fragmentos polimórficos (80,97%) quando comparada à população de Umuarama (PR) que foi a menos polimórfica (53,33%).

Quadro 4 - Número e proporção de fragmentos polimórficos obtidos nas análises RAPD em quatro populações de *Migdolus* sp.

População	Número de Amostra	Número de fragmentos polimórficos	Fragmentos polimórficos (%)
Umuarama	15	132	53,33
Cidade Gaúcha	15	178	72,06
Colorado	15	200	80,97
Tapejara	15	153	61,94
Total	60	244	98,79

Na população de Umuarama, a coleta foi realizada em um amoreiral, diferenciando das outras populações que foi em usinas de cana-de-açúcar. Essa apresentou baixa variabilidade genética. Infere-se que tais dados podem estar relacionados com o pequeno número de fêmeas dessa população, especialmente, devido ao processo de controle dos insetos que é realizado por coleta manual das fêmeas na época de revoada, podendo levar a uma endogamia da população, reduzindo, assim, a variabilidade.

Outro fator que pode estar influenciando na adaptação desses insetos é a cultura em que os mesmos foram coletados, pois a população de Umuarama é a única que foi coletada de um amoreiral, podendo, assim estas populações terem maior adaptabilidade dependendo das características da cultura. O amoreiral é uma cultura de pequena extensão em comparação com a cana-de-açúcar, o que pode

contribuir para menor dispersão destes insetos propiciando cruzamentos consangüíneos.

A população de Tapejara também apresentou baixos valores de variabilidade genética, similares ao de Umuarama, diferente dos valores encontrados na população de Colorado e Cidade Gaúcha. O baixo valor de variabilidade genética da população de Tapejara pode estar relacionado a fatores como variedade da cana-de-açúcar, tipo de controle utilizado pela Usina de cana-de-açúcar ou por fatores climatológicos. A população de Colorado, a qual apresentou maior variabilidade genética, foi coletada em canavial de maior extensão, com predomínio da cultura de cana-de-açúcar na região, o que favorece maior número de indivíduos e maior fluxo gênico. O manejo não adequado desta população também pode estar contribuindo para a resistência de indivíduos e, conseqüentemente, mantendo a variabilidade genética.

Na população de Colorado, foi detectada maior diversidade genética: 0,3969 ($\pm 0,2445$). Na população de Umuarama verificou-se a menor diversidade genética: 0,2619 ($\pm 0,2784$). Os valores do índice de Shannon estão apresentados no Quadro 5.

Quadro 5 - Índice de Diversidade de Shannon (I) das quatro populações de *Migdolus* sp. analisadas

População	Índice de Shannon (I)	Desvio- padrão
Umuarama	0,2619	$\pm 0,2784$
Cidade Gaúcha	0,3514	$\pm 0,2680$
Colorado	0,3969	$\pm 0,2445$
Tapejara	0,2865	$\pm 0,2670$
Média	0,4853	$\pm 0,1861$

Em *Migdolus* sp., a estimativa da diversidade genética pelo índice de Shannon foi de 0,4853 ($\pm 0,1861$), indicando alta diversidade genética.

Para Machado e Fiúza (2010), a alta diversidade genética nas populações é um dos elementos que contribuem para reduzir a eficiência de programas de controle químico e/ou biológico.

O alto valor de G_{ST} (0,3355) para as populações analisadas de *Migdolus* sp. demonstrou que as populações estão altamente diferenciadas. De acordo com

Wright (1978), valores de *Gst* entre 0,15 e 0,25 indicam alto nível de divergência interpopulacional e/ou alto nível de diferenciação genética entre as populações.

A diversidade genética calculada pelos coeficientes de Identidade ou de Distância Genética de Nei (1978) revelou maior identidade genética entre as populações de Cidade Gaúcha e Colorado, com 0,9095 de similaridade. A menor similaridade genética foi encontrada entre as populações de Umuarama e Cidade Gaúcha (0,7808) (Quadro 6).

Apesar das usinas de Cidade Gaúcha e Colorado não apresentarem nenhuma relação entre as empresas, fato este que dificulta o transporte dos insetos através da cana para um possível acasalamento, as duas populações apresentaram uma grande proximidade na identidade genética. Sabe-se que estes insetos possuem uma pequena dispersão. Assim, a grande identidade genética entre as duas populações pode ser em função de ancestral comum. Tais dados demonstram que, devido aos altos valores de identidade genética entre Colorado e Cidade Gaúcha, estas populações não possuem barreiras para o cruzamento entre reprodutores.

Quadro 6 - Valores da Identidade Genética e Distância Genética de Nei (1978) obtidos pelo programa Popgene 1.31 para as quatro populações de *Migdolus* sp.

Pop/ID	Umuarama	Cidade Gaúcha	Colorado	Tapejara
Umuarama	***	0,7808	0,7844	0,8926
Cidade Gaúcha	0,2474	***	0,9095	0,7891
Colorado	0,2428	0,0948	***	0,8020
Tapejara	0,1136	0,2368	0,2206	***

*Os valores da Identidade genética de Nei estão representados acima da diagonal e a Distância de Nei estão abaixo da diagonal.

A análise dos valores da distância genética de Nei (1978), entre as quatro populações analisadas permite inferir que as populações de Umuarama e Cidade Gaúcha apresentaram as maiores distâncias genéticas (0.2474). Estas cidades apresentam uma grande distância geográfica (70 km) em relação à distância de dispersão deste inseto, dificultando, assim, a migração e conseqüentemente o fluxo gênico. Segundo Cantagali (2009), o alto valor de diferenciação genética pode estar

relacionado à existência de um alto polimorfismo ancestral, seguido de deriva genética sem hibridação.

As populações de Cidade Gaúcha e Colorado, por sua vez, apresentaram as menores distâncias genéticas (0.0948) e, geograficamente, apresentam grandes distâncias geográficas (157 km). Isso leva a inferir que não há relação entre distância genética e geográfica entre as duas populações, portanto, podem apresentar uma base de variabilidade genética ancestral, uma vez que as usinas de Cidade Gaúcha e de Colorado não pertence à mesma empresa, dificultando, por isso mesmo, o transporte dos insetos para as diferentes cidades.

O dendrograma baseado no complemento aritmético da distância genética de Nei (1978) (Figura 2) mostra que as populações de Cidade Gaúcha e Colorado foram agrupadas, possuindo a mesma origem quando comparada às demais populações. As populações das cidades de Umuarama e de Tapejara foram agrupadas em outro grupo.

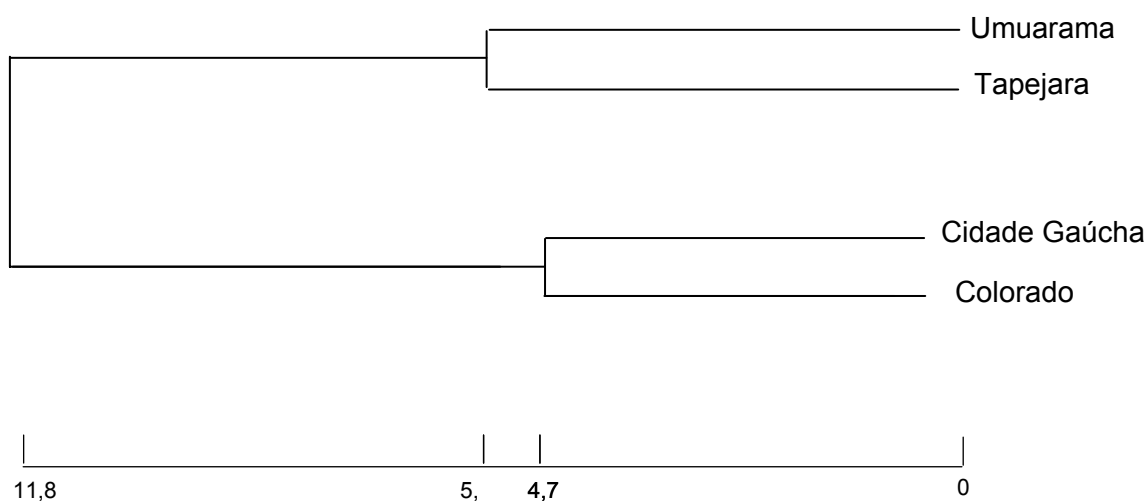


Figura 2 - Dendrograma baseado no complemento aritmético da distância genética de Nei (1978) obtido por marcadores RAPD. Os indivíduos das populações de *Migdolus* sp. coletadas em Umuarama, Cidade Gaúcha, Tapejara e Colorado foram agrupados pelo método UPGMA, utilizando o programa Popgene 1.31.

Os dados da distância genética de Nei (1978) corroboraram com os dados do dendrograma de similaridade de Jaccard. As populações foram divididas em dois grandes grupos: o grupo (A) incluiu as populações de Umuarama e Tapejara; e, o grupo (B), compreende Cidade Gaúcha e Colorado. O grupo (A) foi dividido em dois subgrupos, separando nitidamente as duas populações. Da mesma forma ocorreu

com o grupo (B), no qual as duas populações foram separadas, ficando Cidade Gaúcha no primeiro subgrupo e Colorado no segundo subgrupo.

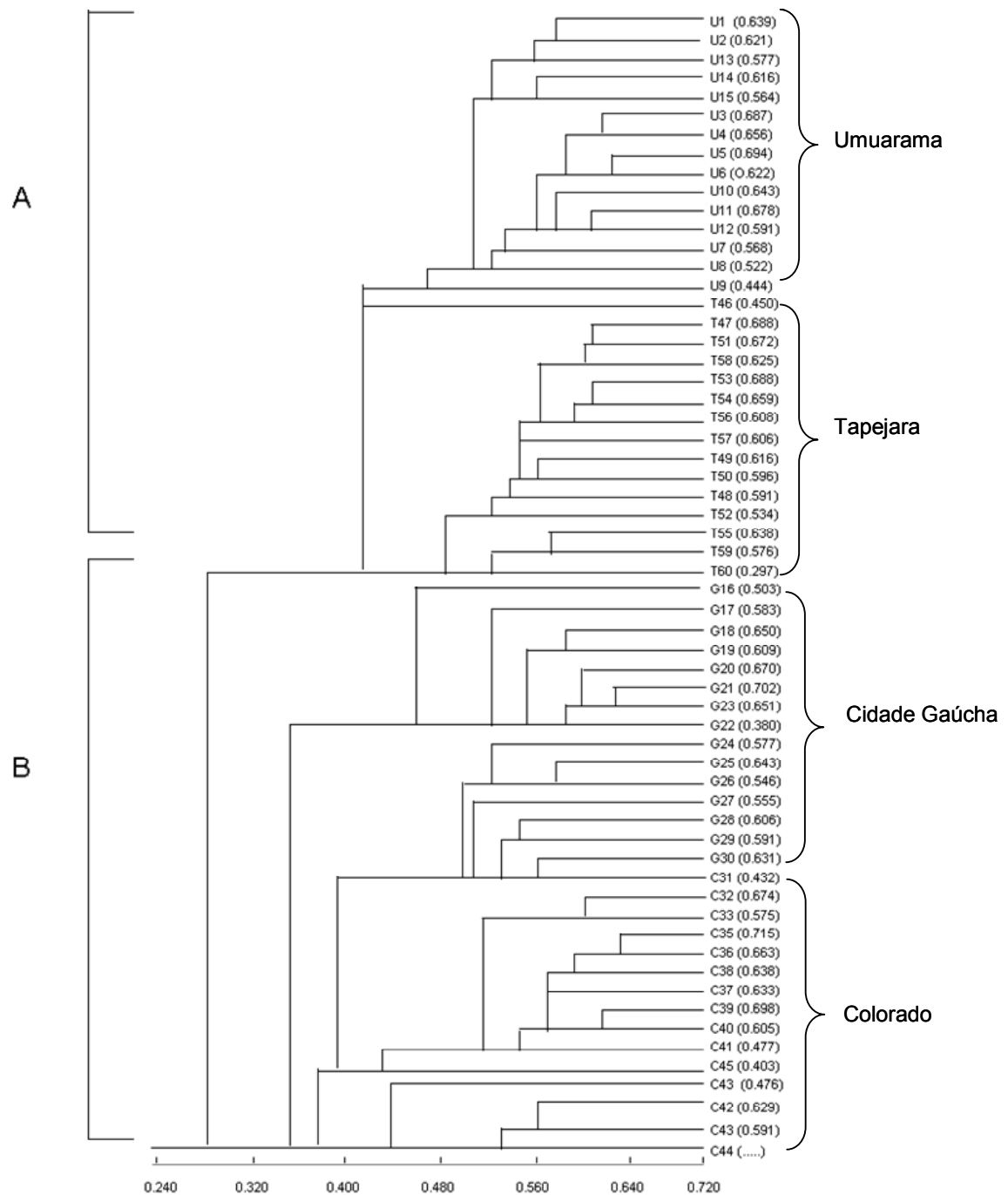


Figura 3 - Dendrograma baseado no complemento aritmético do coeficiente de Jaccard, obtido por marcadores RAPD. Os indivíduos de Umuarama (U), Tapejara

(T), formados pelo grupo A, e Cidade Gaúcha (G) e Colorado (C) pelo grupo B. analisados foram agrupados pelo método UPGMA, utilizando o programa NTSYS.

Considerando o pequeno tempo da introdução de *Migdolus* sp. nas culturas de cana-de-açúcar e, possivelmente, a ausência de acasalamentos entre as populações analisadas, conforme observado no dendrograma de Jaccard (Figura 3), verificou-se que essas populações apresentam um alto grau de diferenciação ($G_{ST} = 0,3355$). Os resultados sugerem que, apesar da introdução recente desta espécie, já pode ter ocorrido o processo de diferenciação ou até mesmo de especiação.

A alta variabilidade das populações analisadas pode estar relacionada ao grande polimorfismo de ancestral, pois a troca de material genético por cruzamento é dificultada em razão da pequena dispersão do inseto. Com isso, pode ocorrer uma redução da variabilidade com o passar dos anos, haja vista o isolamento das populações.

Os dados demonstram que, em razão da alta diferenciação genética entre as populações, a ocorrência de resistência cruzada será mais difícil. Entretanto, o elevado valor de polimorfismo observado (98,79%) para as diferentes populações das regiões estudadas, indica que essa espécie de besouro está bem adaptada à região. Os dados mostram a probabilidade de resistência, daí a necessidade de desenvolvimento de programas integrados de controle da praga.

Os altos valores de variabilidade genética detectados podem estar relacionados com a resistência desse inseto praga a inseticidas. Contudo será necessário o desenvolvimento de bioensaios mais específicos para entender de forma mais abrangente a relação entre a variabilidade genética e a resistência.

Após o entendimento da resistência poderão ser desenvolvidas novas formas de manejo e controle desta espécie ou melhorar as formas já existentes.

4. CONCLUSÕES

As populações de *Migdolus* sp. analisadas apresentaram alta porcentagem de locos RAPD polimórficos.

A população de Umuarama apresentou a menor variabilidade genética.

As populações de Cidade Gaúcha e de Colorado apresentaram a maior similaridade genética, podendo assim o cruzamento entre os reprodutores.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- a) O perfil eletroforético das esterases e a sensibilidade a inibidores permitiram identificar quatro isoenzimas que provavelmente participam de mecanismos de resistência a inseticidas em *Migdolus*: EST-1, EST-2, EST-5 e EST-7. Será necessária a realização de bioensaios com os diferentes grupos de inseticidas para verificar o papel dessas isoenzimas nos mecanismos de desintoxicação do inseto.
- b) O maior número de peptídeos presente na análise SDS-PAGE de extratos de macho provavelmente está associado aos mecanismos reprodutivos de *Migdolus* e merecem novos estudos para o seu melhor entendimento.
- c) Os protocolos desenvolvidos para isolamento do DNA total e PCR para primers RAPD permitirão a análise acurada, com repetibilidade e precisão do marcador molecular.
- d) As populações de *Migdolus* das regiões de Umuarama, Tapejara, Cidade Gaúcha e Colorado apresentaram grande polimorfismo e estão diferenciadas, dificultando a resistência cruzada. O isolamento populacional, devido principalmente à baixa capacidade de dispersão das fêmeas, poderá levar a uma redução da variabilidade genética ao longo do tempo.
- e) Programas de controle e manejo dessa espécie precisam ser desenvolvidos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENTO, J.M.S.; LUCIA, T.M.C.D.; VILELA, E.F.; ARRIGONI, E.B.; LEAL, W.S. *Migdolus*. In: SALVADORI, J.R. **Pragas do solo o Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2004. 544p.
- BENTO, J.M.S.; VILELA, E.F.; DELLA LÚCIA, T.M.C.; LEAL, W.S.; NOVARETTI, W.E.T. ***Migdolus***: biologia, comportamento e controle. Salvador: 1995. 58p.
- BENTO, J.M.S.; ALBINO F.E.; DELLA LÚCIA T.M.C.; VILELA, E.F. Field trapping of *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Cerambycidae) using natural sex pheromone. **Journal of Chemical Ecology**, 18:245-251, 1992.
- CANTAGALLI, L.B. **Formigas cortadeiras: aspectos genético-bioquímicos da contaminação com agrotóxicos e estrutura de populações**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2009. 67p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento).
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12:13-15, 1990.
- KIM, K.S.; SAPIINGTON, T.W. Genetic structuring of boll weevil populations in the US based on RAPD markers. **Insect Molecular Biology**, 13:293-303, 2004.
- LEWONTIN, R.C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, 6:381-398, 1972.
- MACHADO, L.A.; HABIB, M. *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae): praga da cultura de cana-de-açúcar. **Journal of Biology**, 73:375-381, 2006.
- MACHADO, L.A.; HABIB, M.; LEITE, L.G.; GOULART, R.M.; TAVARES, F.M.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M. Patogenicidade de *Heterorhabditis* sp. a ovos de *Migdolus fryanus*, broca da raiz da cana-de-açúcar. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, São Pedro, 2003. **Resumos....** São Pedro: Siconbiol, 2003. p. 86.

MACHADO, V.; FIÚZA, L.M. Evolução e manejo da resistência de insetos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 11:68-74, 2010.

MARTINS, W.F.; AYRES, C.F.; LUCENA, W.A. Genetic diversity of Brazilian natural populations of *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), the major cotton pest in the New World. **Genetics and Molecular Research**, 27:23-32, 2007.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, 89:583-590, 1978.

ROHLF, F.J. **NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**. New York: Exeter Publishers, 1989. 257p.

SIDORENKO, A.P.; BEREZOVSAYA, O.P. Individual Polymorphism for RAPD Markers in Spring Generation of Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say). **Russian Journal of Genetics**, 37:1130-1133, 2001.

WILCKEN, C.F.; ORLATO, C.; OTTATI, A.L.T. Ocorrência DE *Migdolus fryanus* (COLEOPTERA: CERAMBYCIDAE) em plantios de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. **Revista Árvore**, 29:171-173, 2005.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18: 6531-6535, 1990.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Chicago: University of Chicago, 1978. 580p.

YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. **POPGENE Version 1.31**: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. Edmonton: University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.