

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

**DANIELLE DAS NEVES BESPALHOK**

**Polimorfismo enzimático em *Sitophilus oryzae* (Coleoptera,  
Curculionidae) da região sul do Brasil**

**MARINGÁ  
PARANÁ - PARANÁ  
FEVEREIRO - 2012**

**DANIELLE DAS NEVES BESPALHOK**

**Polimorfismo enzimático em *Sitophilus oryzae* (Coleoptera,  
Curculionidae) da região sul do Brasil**

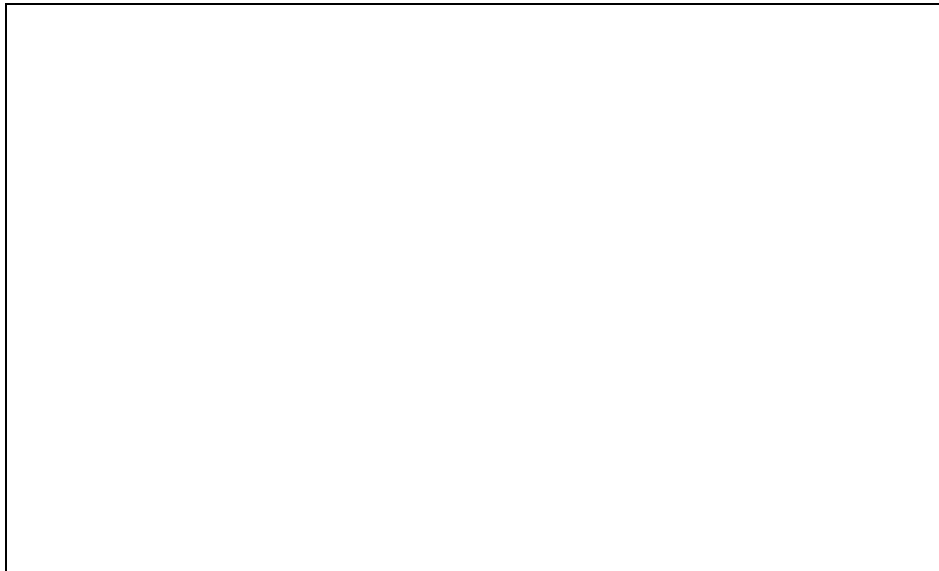
Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Erasmo Renesto.

**MARINGÁ  
PARANÁ - PARANÁ  
FEVEREIRO – 2012**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

(Biblioteca Central - UEM. Maringá, PR, Brasil)



Ao meu tio, Demétrio Bepalhok (*in memoriam*), que sempre me ajudou e me mostrou a importância em traçar metas e cumpri-las. Suas lições foram imprescindíveis para minha vida.

Aos meus pais, Oscar Eugênio Bepalhok e Tereza Messias das Neves Bepalhok, e aos meus irmãos que, com muito amor e carinho, me incentivaram e me apoiaram ao longo desta caminhada.

Ao meu namorado e companheiro, Antonio Guido.

A todos, com muito amor e carinho, dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida, amor, proteção, por ter me dado uma família maravilhosa, meu namorado e meus amigos e por ter me permitido mais essa conquista.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pela oportunidade.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Capes), pela concessão de bolsa de estudos.

Ao professor doutor Erasmo Renesto, pela orientação, incentivo, amizade, apoio e paciência durante a realização desse trabalho.

Aos docentes que auxiliaram na minha caminhada até aqui, em especial, às professoras doutoras Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki, Claudete Aparecida Mangolin, Maria de Fátima Pires da Silva Machado e Sandra Aparecida Oliveira Collet e ao professor doutor José Ricardo Penteado, pela atenção e auxílio nos momentos de dúvidas.

À professora doutora Ana Silvia Lapenta e ao professor doutor Rogério Pincela Mateus, por participarem da banca examinadora e pelas importantes sugestões para este trabalho.

Ao Dr. Paulo Roberto Valle da Silva Pereira que, além de ceder amostras, auxiliou-me na identificação das espécies e ajudou em vários momentos de dúvidas.

Ao amigo Tiago Signorini, agradeço pela amizade sincera, pelo companheirismo, pela ajuda nas horas de dúvidas e por tudo o que passamos juntos nesses dois anos.

Ao amigo Flávio Codognotto, pelo incentivo e ajuda na execução da prática deste trabalho. Até aki

Ao Fúlvio Zanete Paixão e ao Cleisson Trevisan, pela cessão das amostras utilizadas neste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Genética Animal e do Laboratório de Cultura de Tecido e Eletroforese Vegetal, que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.

Aos secretários do Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, Francisco José da Cruz e Maria Valquíria Magro, pela paciência, amizade, atenção e gentileza.

## **BIOGRAFIA**

DANIELLE DAS NEVES BESPALHOK, filha de Oscar Eugênio Bespalhok e Tereza Messias das Neves Bespalhok, nasceu em 19 de abril de 1982, na cidade de Londrina, estado do Paraná.

No ano de 1996, concluiu o Ensino Fundamental no Colégio Estadual Sagrada Família, na cidade de Londrina, estado do Paraná.

Concluiu o Ensino Médio, em 1999, no Instituto Adventista Paranaense, na cidade de Ivatuba, estado do Paraná.

Ingressou no Curso de Ciências Biológicas, em março de 2005, na Universidade Estadual de Maringá, estado do Paraná, obtendo o título de Licenciado em Ciências Biológicas em janeiro de 2010.

Em março de 2010, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), da Universidade Estadual de Maringá (UEM), estado do Paraná.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1. Considerações sobre <i>Sitophilus oryzae</i> .....	4
2.2. Polimorfismo genético.....	7
2.3. Eletroforese de isozimas.....	8
2.4. Variabilidade genética de populações naturais.....	10
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
3.1. Coleta e armazenamento.....	14
3.2. Preparação dos extratos.....	14
3.3. Separação eletroforética.....	14
3.3.1. Gel de amido.....	15
3.3.2. Corrida eletroforética.....	15
3.4. Revelação e conservação do gel.....	16
3.5. Interpretação genética.....	16
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>27</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>28</b>

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Nome, número de comissão de enzima (n <sup>o</sup> . E.C.) e estrutura quaternária (E.Q.) das enzimas analisadas em gel de amido .....	17
Quadro 2 - Frequência dos alelos nas 3 amostras de <i>Sitophilus oryzae</i> : amostra do município de Floresta –PR; amostra do município de Xavantina – SC; amostra do município de Passo Fundo - RS. ....	20
Quadro 3 - Medidas de variabilidade genética: He: heterozigosidade esperada; Ho: heterozigosidade observada; P%: proporção de locos polimórficos; K: número de alelos .....	21
Quadro 4 - Comparação dos valores de He: heterozigosidade esperada, das amostras do PR, SC, RS e de 170 espécies de insetos (Ward et al.,1992) .....	22
Quadro 5 - Resumo da estatística F para três amostras de <i>S. oryzae</i> .....	24
Quadro 6 - Valores de identidade genética (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) de Nei (1978) para três amostras de <i>S. oryzae</i> .....	25



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - *Sitophilus oryzae* (a), larva *Sitophilus spp.* (b) (escala: 1 mm). .....6
- Figura 2 - Zimograma simbolizando o padrão de bandas dos 8 sistemas isoenzimáticos analisados em gel de amido, com os seus respectivos alelos, presentes nas amostras (amostra do município de Floresta -PR; amostra do município de Xavantina - SC; amostra do município de Passo Fundo - RS..... 19

## RESUMO

BESPALHOK, Danielle das Neves, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2012. **Polimorfismo enzimático em *Sitophilus oryzae* (Coleoptera, Curculionidae) da região sul do Brasil.** Orientador: Erasmo Renesto. Conselheiros: Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki e Claudete Aparecida Mangolin.

*Sitophilus oryzae*, vulgarmente conhecido como gorgulho do arroz, é uma espécie cosmopolita da Índia, considerada uma praga de grande importância econômica. Além do arroz, *S. oryzae* infesta trigo, aveia, centeio, cevada, milho, alpiste e girassol. Esta praga é uma das ameaças mais visíveis para a produção sustentável de alimentos. Este trabalho teve como objetivo estimar a variabilidade genética de *S. oryzae* em três amostras, uma do estado do Paraná (PR), uma do estado de Santa Catarina (SC) e uma do estado do Rio Grande do Sul (RS), com base em eletroforese de isozimas, visando ao fornecimento de subsídios para futuros estudos evolutivos e de conservação de recursos naturais. Para isso, foi utilizada a técnica de eletroforese de isozimas em gel de amido para a análise de oito sistemas enzimáticos (AAT, ACP, GDH, GPI, IDH, MDH, ME e PGM). Foram detectados 10 locos enzimáticos e 18 alelos. A heterozigosidade média observada foi de 0,0091, 0,0100 e 0,0000 e a esperada foi de 0,0419, 0,0452 e 0,0000 para as amostras do PR, SC e RS, respectivamente, com porcentagem de locos polimórficos de 30% na amostra do PR, 30% na amostra de SC e 0% na amostra do RS. O número médio de alelos por loco variou de 1,4 a 1,0. Foram estimados também os valores para identidade genética (I): entre as amostras do PR e SC I= 0,6892, entre PR e RS I= 0,9983 e entre SC e RS I= 0,6925. Os valores da distância genética de Nei (1978) foram de 0,3722 entre as amostras de PR e SC; de 0,3675 entre RS e SC; e de 0,0017 entre as amostras de PR e RS.

Palavras-chave: *Sitophilus*, polimorfismo, heterozigosidade.

## ABSTRACT

BESPALHOK, Danielle das Neves, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2012. **Enzyme polymorphism in *Sitophilus oryzae* (Coleoptera, Curculionidae) in southern Brasil.** Adviser: Erasmo Renesto. Committee Members: Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki and Claudete Aparecida Mangolin.

*Sitophilus oryzae*, (rice weevil), is a cosmopolitan species of India and considered a pest of great economic importance. In rice, *S. oryzae* infests wheat, oats, rye, barley, millet, canary seed, sunflower. This pest is one of the most visible threats to sustainable food production. This study aimed to estimate the genetic variability of *S. oryzae* in three populations, one from the State of Parana, other from Santa Catarina State and another one in Rio Grande do Sul State, based on isozyme electrophoresis, in order to provide subsidies to evolutionary studies and conservation of natural resources. For this, the technique of isozyme electrophoresis in starch gel was used for analysis of eight enzyme systems (AAT, ACP, GDH, GPI, IDH, MDH, ME and PGM). Ten loci and 18 alleles were detected. The average observed heterozygosity was 0.0091, 0.0100 and 0.0000 and the average expected heterozygosity was 0.0419, 0.0452 and 0.0000 for the populations of PR, SC and RS respectively. The percentage of polymorphic loci in populations was 30% of PR and SC 0% of the population not presenting the RS polymorphism. The average number of alleles per locus ranged from 1.4 to 1.0. The estimated values for genetic identity (*I*) between populations of SC and PR, PR and RS and between populations of SC and RS were  $I = 0.6892$ ,  $I = 0.9983$  and  $I = 0.6925$ , respectively. The Nei's genetic distance were 0.3722, 0.3675 and 0.0017 for differences between PR vs. SC, RS vs. SC and PR vs. RS respectively.

Keywords: *Sitophilus*, polymorphism, Heterozygosity.

## 1. INTRODUÇÃO

A Classe Insecta (lat. seccionado, em partes distintas) perfaz mais de 900.000 espécies. São os mais abundantes e dispersos de todos os animais terrestres, sendo os mais importantes invertebrados que podem viver em ambientes secos e os únicos capazes de voar. Estes hábitos se tornam possíveis graças ao revestimento quitinoso do corpo, que protege os órgãos internos contra danos e perda de umidade, pelas extensões deste revestimento que formam as asas e pelo sistema de tubos traqueais que possibilitam aos insetos respirar ar. Os insetos abundam em todos os habitats, exceto o mar (Storer, 2003).

A entomologia (gr. *entomon*, inseto) é a ciência que se ocupa dos insetos. Devido ao número e às muitas relações biológicas, eles são de grande significação econômica; alguns são úteis e muitos prejudiciais aos interesses do homem (Storer, 2003).

Conforme Hickman (2004), a classe dos insetos está dividida em 27 ordens e, segundo Gallo et al. (2002), a ordem Coleoptera é enorme devido, principalmente, ao grande número de espécies consideradas pragas agrícolas, além de muitas outras que atacam grãos armazenados, livros e outros.

Exemplos de gorgulho da ordem Coleoptera e família Curculionidae são *Sitophilus zeamais* (Motschulsky, 1855) e *Sitophilus oryzae* (Linnaeus, 1763). De acordo com levantamentos realizados em São Paulo e, mais tarde, em vários estados brasileiros, *S. zeamais* é a primeira espécie predominante atacando o arroz. São espécies muito semelhantes quanto à morfologia, podendo ser seguramente separadas pela genitália (Gallo et al., 1988). Esses autores também consideram que, pela proximidade das espécies, os dados de biologia obtidos para *S. zeamais*, podem ser estendidos a *S. oryzae* (Vieira, 1999).

Os seguidos recordes de produção de grãos foram atingidos através da adoção de uma agricultura baseada na monocultura de larga escala, a qual é responsável por considerável desequilíbrio ambiental. No lugar da vegetação, que se desenvolveu por milênios, a substituição da diversidade natural de plantas, em milhões de hectares por uma ou poucas espécies, tornou inevitável o surgimento de pragas e doenças, que encontram nas plantas alimento farto e condição de reprodução (Castro, 2008).

Alguns relatórios do Ministério da Agricultura e do Abastecimento revelam que as perdas quantitativas causadas por insetos são da ordem de 10% na produção anual de grãos no Brasil. E estima-se que as perdas quantitativas anuais causadas por pragas durante o período de armazenamento de grãos são da ordem de 10% da produção mundial (Almeida, 1989).

Conforme dados da Conab (Companhia Nacional de Abastecimento), no ano de 2011, foram produzidas no Brasil aproximadamente 161,54 milhões de toneladas de grãos (Conab).

Estima-se que cerca de 20% do volume total de grãos colhidos anualmente no Brasil são desperdiçados no processo de colheita, no transporte e no armazenamento e que metade dessa perda é devido ao ataque de pragas durante armazenamento. Dentre os prejuízos, verificam-se perdas de massa e poder germinativo das sementes, desvalorização do produto e um meio favorável para a disseminação de fungos e outros microrganismos, cuja principal praga em sementes e grãos de arroz armazenados é o gorgulho do arroz (Puzzi, 1986).

As pragas são as maiores causadoras de perdas físicas, além de serem responsáveis pela perda na qualidade dos grãos e dos subprodutos. Existem dois importantes grupos de pragas que atacam os grãos armazenados: os besouros e as traças. Nos besouros, encontram-se as espécies mais importantes por causarem maiores danos. Para o arroz, a praga mais importante é o *Sitophilus oryzae* (Pacheco e De Paula, 1995).

O mercado mundial de agrotóxicos movimenta bilhões de dólares anualmente. Tradicionalmente, os inseticidas mais usados têm sido os piretróides e os fosforados, seguidos dos organoclorados (Vieira et al., 2003). Esses produtos apresentam um amplo espectro de ação e exterminam indiscriminadamente os insetos-pragas, bem como aqueles que são benéficos ao ambiente. Essa situação é agravada pela persistência desses produtos no meio ambiente e por meio de resíduos tóxicos em um grande número de alimentos (Costa e Costa, 2004).

As pragas, os patógenos e as ervas daninhas são as ameaças mais visíveis para a produção sustentável de alimentos. Desde a Segunda Guerra Mundial, a atitude mais comum diante desses problemas tem sido a aplicação de agrotóxicos. Além dos riscos que apresentam para a saúde humana, o uso contínuo destes produtos pode levar ao desenvolvimento de resistência no organismo-alvo, além da

eliminação dos inimigos naturais. Baseado nessas constatações, pode-se afirmar que os agrotóxicos sintéticos provocam alto impacto ambiental (Azevedo, 2003).

Embora haja muitos estudos com o *Sitophilus oryzae* visando seu controle, pouco se sabe sobre a variabilidade genética desta espécie. Os únicos estudos foram feitos por Beiras e Petitpierre (1981), Pintureau et al. (1991) e Genier et al. (1994) que analisaram esterases de três espécies de *Sitophilus* da Europa. Algumas análises de microssatélites foram feitas, mas em outras espécies de Curculionidae (Liewlaksaneeyanawin et al., 2002; Kim et al., 2006).

A caracterização da variabilidade genética em populações de pestes de culturas, bem como dos fatores que mantêm esta variabilidade são muito importantes na elaboração de programas de controle mais efetivos. Durante os últimos 20 anos, tem se verificado que o uso de marcadores moleculares é uma boa ferramenta para estudos de genética de populações, de biologia evolutiva, taxonomia e de biologia de conservação, permitindo análise da diversidade e da diferenciação genética de populações naturais (Van Oosterhout et al., 2004).

O objetivo desse trabalho foi o de estimar a variabilidade genética de *Sitophilus oryzae* em três amostras, uma do estado do Paraná, uma de Santa Catarina e uma do Rio Grande do Sul, com base em eletroforese de isozimas, visando ao fornecimento de subsídios para futuros estudos evolutivos e de conservação de recursos naturais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Considerações sobre *Sitophilus oryzae*

*Sitophilus oryzae*, vulgarmente conhecida como gorgulho do arroz, foi descrita por Linnaeus em 1763. É uma espécie cosmopolita da Índia e considerada uma praga de grande importância econômica (Vital et al., 2004).

Os gorgulhos do arroz são insetos que se adaptam melhor em ambientes de clima tropical e quente, normalmente encontrados em alojamentos de armazenamento de grãos ou na própria planta, infestando trigo, aveia, centeio, cevada, arroz e milho. Eles podem ser encontrados às vezes infestando feijão, alpiste, girassol, milho seco e também, em menor grau, macarrão e mandioca desidratada (Evans, 1981; Gallo et al., 1988).

Conforme Pacheco e De Paula (1995), *S. oryzae* é muito semelhante ao *Sitophilus zeamais* Motschulsky (1855) quanto à biologia, etiologia e a morfologia das formas adultas e jovens. A distinção dessas duas espécies se faz por meio de características externas. A mais segura é a técnica de Kuschel, proposta em 1961, que as diferencia com base nas genitálias.

De acordo com Hickman (2004), *S. oryzae* pertence não só à classe maior em número de espécies, Insecta, mas também à ordem Coleoptera, que é a mais numerosa do mundo. Os Coleoptera representam uma das ordens de maior interesse agrícola, pois um grande número de espécies são pragas de culturas, de grãos armazenados (Ribeiro-Costa, 2006) e, conforme Gallo et al. (2002), a família Curculionidae é também a mais numerosa do reino animal e os insetos-pragas mais importantes estão nessa família, da qual o *S. oryzae* faz parte.

*Sitophilus oryzae* é uma praga primária interna de grande importância, pois pode apresentar infestações cruzadas, ou seja, infestar grãos no campo e também no armazém. Tanto larvas como adultos são prejudiciais e atacam o interior dos grãos (Embrapa, 2011). Atacam grãos inteiros, alimentando-se de todo o seu conteúdo (germe e endosperma). Normalmente uma larva consome totalmente um grão de trigo ou arroz durante o seu desenvolvimento, mas em milho diversas larvas podem desenvolver-se em um único grão (Pereira, 2006).

O gorgulho afeta a qualidade e a quantidade de arroz descascado ou em casca, quando os grãos apresentarem aberturas nas cascas, além de facilitar a

infestação dos artrópodes secundários e terciários. Podem infestar a massa de grãos a mais de um metro de profundidade (Vieira, 1999).

A fêmea pode produzir de 150 a 400 ovos, com tamanho médio de 0,65 x 0,27 mm, durante a sua vida e em condições favoráveis ter de 12 a 13 gerações por ano, sendo, portanto, a responsável por grandes prejuízos em unidades armazenadoras (Athié, 2002). No Brasil, está entre os 30 insetos-pragas de maior importância que atacam grãos, podendo frequentemente causar também sérios danos para agricultura (Stresser, 2010).

Segundo Pereira (2006), a postura dos ovos é feita no interior dos grãos pelas fêmeas, as quais fecham os mesmos com secreção serosa sendo feita em uma faixa de temperatura de 15° a 30°C e com teor de água acima dos 10,5 %, a incubação dura cerca de seis dias a uma temperatura de 25°C. As fêmeas continuam a ovipositar até a morte. A larva branca e sem pernas, alimenta-se no interior do grão escavando um túnel, em cerca de 25 dias (a 25°C e 70% de umidade relativa) passa por quatro ínstaes larvais e o empupamento ocorre dentro do grão. Os adultos vivem de quatro a 12 meses e o ciclo evolutivo completa-se em 35 dias, sob condições ideais de temperatura e umidade.

O *S. oryzae* apresenta elevado potencial de reprodução, pois possui muitos hospedeiros. Ele ataca, penetrando toda a massa de grãos, e os danos causados se verificam na redução do peso e da qualidade do grão (Embrapa, 2011).

Conforme Vieira (1999), *S. oryzae* resiste várias horas a 0°C e a duas ou três semanas sem alimento. São bons voadores, principalmente *S. zeamais*, o que lhes permite infestação cruzada (Gallo et al., 1988).

Na fase inicial, os insetos se alimentam quase que exclusivamente do endosperma e depois do embrião, causando perda de peso e de nutrientes além de afetar o poder germinativo das sementes (Puzzi, 1986). Os insetos adultos caracterizam-se por apresentar elevado potencial biótico, possibilidade de ocorrência de infestação cruzada e pela capacidade de atacar e danificar um grande número de hospedeiro (Gallo et al., 2002).

Como a maioria dos organismos vivos, os insetos também produzem enzimas digestivas para a obtenção dos nutrientes essenciais às suas atividades metabólicas. Das 14 enzimas digestivas utilizadas pelos insetos, 12 já foram caracterizadas em diferentes espécies. Dentre essas, as mais estudadas atualmente são as  $\alpha$ -amilases (Marsaro Júnior, 2011).





Figura 1 - *Sitophilus oryzae* (a), larva *Sitophilus spp.* (b) (escala: 1 mm).  
Fonte: Pereira, 2006.

As  $\alpha$ -amilases constituem uma família de endoamilases que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 do amido, glicogênio e outros carboidratos. Essas enzimas são muito importantes para os insetos, especialmente para aqueles que se desenvolvem em grãos ricos em amido (Marsaro Júnior, 2011). É desta maneira que o *S. oryzae* apresenta a característica de degradar grãos ricos em amido, em especial o arroz.

De acordo com Stresser (2010), os prejuízos causados pelos insetos em grãos e outros produtos armazenados podem ser resumidos nos seguintes itens:

- Perda no peso dos produtos pela destruição do endosperma.
- Perda no valor nutritivo pela destruição do amido e do germe.
- Perda de germinação pela destruição do germe.
- Perda qualitativa pela presença de grãos e produtos bichados e a disseminação dos fungos e ácaros que provocam odores estranhos e toxinas prejudiciais à saúde dos consumidores.
- Perda na qualidade de panificação das farinhas pela destruição do glúten;
- Perda de produtos já elaborados, pela presença de insetos vivos e destruição e/ou avaria das embalagens.

Há estudos envolvendo plantas geneticamente modificadas, que possuem inibidores de algumas enzimas digestivas de insetos e poderão contribuir para a

redução do uso de inseticidas, acarretando mínimo impacto ambiental. Porém, ainda é necessário muitos estudos, pois não se sabe ao certo os impactos dessas plantas ao meio ambiente e à saúde do homem. E esses estudos não envolvem todos os principais insetos e nem todas as culturas. Sendo assim a necessidade de mais estudos é muito relevante num futuro próximo.

## **2.2. Polimorfismo genético**

A utilização de marcadores protéicos (isoenzimáticos) tem se mostrado eficaz por serem bastante informativos, podendo ser empregados em estudos de relações filogenéticas (Lara et al., 2001). Os polimorfismos de proteínas constituem sistemas para a caracterização genética, uma vez que revelam as modificações ocorridas na sequência codificadora do DNA (Lara, 1998) que alteram a estrutura ou carga da molécula.

Polimorfismo é a ocorrência conjunta, na mesma localidade, de duas ou mais formas descontínuas de uma espécie, em proporções tais que a mais rara das formas não pode ser mantida simplesmente por mutação recorrente (Ford, 1975).

Um gene que possui um dos alelos com frequência entre 1% e 99% deve ser classificado como gene polimórfico; aquele com frequência inferior a 1% deve ser denominado gene idiomórfico; enquanto um gene com frequência superior a 99% deve ser classificado como gene monomórfico (Morton, 1976/1977). Entretanto, é conveniente deixar bem claro que um loco polimórfico pode incluir entre os alelos a ele pertencentes um ou vários alelos idiomórficos. Assim, por exemplo, se os alelos A, a e a1 de determinado loco tiverem frequências gênicas iguais, respectivamente, a 0,600, 0,395 e 0,005, diremos que os alelos A e a são polimórficos, enquanto o alelo a1 são idiomórficos. Por sua vez, os caracteres que resultam de locos que incluem pelo menos dois alelos polimórficos são denominados polimorfismos genéticos ou sistemas genéticos polimórficos (Beiguelman, 2008).

Polimorfismos podem atuar como marcadores genéticos, já que são transmitidos associados a outros genes localizados na região cromossômica próxima a eles (linkage). Desta forma, se um gene próximo a um marcador causa uma doença, todos os indivíduos afetados na família possuem uma grande probabilidade de receberem tanto o marcador como o gene causador da doença (Balasubramanian, 2004).

### 2.3. Eletroforese de isozimas

O termo isoenzima, também encontrado na literatura como isozima, foi introduzido em 1959, por Market e Moller, para designar formas moleculares múltiplas de enzimas que ocorrem em um mesmo organismo e em membros de mesma espécie. Os organismos geralmente sintetizam formas moleculares múltiplas de enzimas com a mesma especificidade enzimática (Borém e Caixeta, 2009),

As isoenzimas são controladas geneticamente por um ou vários genes, situados em um mesmo loco ou locos diferentes (Scandalios, 1969; Market, 1975). Quando elas representam a expressão fenotípica de alelos situados em um mesmo loco, são denominadas alozimas (Conkle, et., 1982).

As isoenzimas podem ser produtos de diferentes sítios genéticos ou resultar de alterações secundárias na estrutura de espécies polipeptídicas únicas. As isoenzimas podem ser geradas, ainda, pela duplicação do gene, com mutações subsequentes nos locos. Assim, mais de um gene contribuiu para a estrutura de algumas enzimas compostas por mais de um tipo de subunidade. Formas múltiplas de enzimas podem surgir, também, pela ação de agentes, físicos ou químicos, não-genéticos (Scandalios, 1975).

Existem vários métodos bioquímicos que detectam, isolam e distinguem as isozimas: cromatografia, filtração gélida, eletroforese e outros. Entretanto a eletroforese é a mais eficiente técnica analítica disponível para separar isoenzimas, seja pelas contínuas pesquisas e inovações da área, seja pela simplicidade dos equipamentos utilizados (Pierce e Brewbaker, 1973; Brown, 1978).

De acordo com Alfenas (2006), o termo eletroforese foi criado por Michaelis, em 1909, para descrever a migração de colóides sob influência de um campo elétrico. Portanto, eletroforese representa a migração de íons submetidos à corrente elétrica. Seu princípio é simples: moléculas com carga negativa (ânions) migram para o pólo positivo (ânodo) e moléculas com carga positiva (cátions) migram para o polo negativo (cátodo).

A eletroforese visa à separação de moléculas em função de suas cargas elétricas, de seus pesos moleculares e de suas conformações, em suportes porosos e tampões apropriados, sob influência de um campo elétrico contínuo. E pode ser usada para a determinação do peso molecular de proteínas e caracterização de moléculas de ácidos nucleicos (DNA e RNA). Progressos na tecnologia do DNA

recombinante, no mapeamento dos fragmentos de restrição e no sequenciamento dos nucleotídeos dos fragmentos dos ácidos nucléicos têm tornado esta técnica um potencial analítico perspicaz (Alfenas, 2006).

Os meios-suportes geralmente utilizados em eletroforese são o papel-filtro, o acetato de celulose e os géis de ágar, poliacrilamida e amido (Brewer e Sing, 1970).

O gel de amido hidrolisado, como suporte na separação eletroforética, foi utilizado pela primeira vez por Smithies (1955) e veio a constituir grande impulso no desenvolvimento da eletroforese. Pouco tempo depois, Hunter e Market (1957) adaptaram à eletroforese métodos histoquímicos de coloração, para localizar as zonas de atividade enzimática diretamente no meio-suporte, obtendo o “zimograma”, nome dado ao conjunto das bandas isoenzimáticas reveladas nos géis. Dessa maneira, a composição enzimática dos homogenados de tecidos passou a ser revelada com mínimo de intervenção bioquímica e alto poder de resolução (Borém e Caixeta, 2009).

Estudos sobre eletroforese de isoenzimas têm fornecido informações importantes sobre a variabilidade genética de populações naturais, estimativas de fluxo gênico, elucidação dos limites interespecíficos e estabelecimento de relações evolutivas entre diferentes táxons (Solferini e Selivon, 2001). Os critérios morfológicos não fornecem evidências claras para validade de um gênero, mas estimativas de distância genética poderiam fornecer dados valorosos e objetivos (Thorpe 1982; Nei 1987). A eletroforese de isoenzimas tem sido amplamente usada para resolver problemas de biologia evolutiva e problemas populacionais (Marques, 2002); para estudos sobre processos de hibridização natural; no estudo de dispersão de espécies; na análise de filogenias; e no melhoramento genético de plantas (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Futuyama (1992) considera a eletroforese de isoenzimas uma ferramenta poderosa para estimar o grau em que populações realmente divergem nas frequências alélicas, o que é impossível utilizando características morfológicas.

A eletroforese de isoenzimas possui algumas vantagens, como (I) custo relativamente baixo; (II) facilmente adaptável para qualquer grupo de organismos e (III) permite analisar um grande número de indivíduos e um grande número de locos na mesma amostra; (IV) o controle genético para a maioria das isoenzimas é conhecido e isso permite que as inferências genéticas sejam feitas diretamente nos padrões de bandas com objetividade; (V) fornecem amplas informações genéticas

para diversas aplicações; (VI) vários locos isoenzimáticos podem ser analisados ao mesmo tempo; e (VII) pode-se também visualizar homozigotos e heterozigotos, por se tratar de um marcador codominante (Avisé, 1975; Ferreira e Grattapaglia, 1998; Solferini e Selivon, 2001).

Entretanto, o método pode subestimar os níveis de variabilidade genética, visto que mutações no DNA nem sempre levam a alterações na estrutura protéica e nem toda alteração na sequência de aminoácidos provoca diferença na mobilidade eletroforética (Solferini e Selivon, 2001). Outras limitações do método são as modificações pós-tradução das enzimas, onde aparecem formas múltiplas do produto de um único gene e ainda o polimorfismo isoenzimático em resposta a estímulos ambientais (Ferreira e Grattapaglia, 1998). De acordo com Futuyma, (1992), alguns locos altamente variáveis apresentam produto eletroforético com mobilidade similar no gel, caracterizando um eletromorfo. Desta forma, a mesma banda, após a corrida, irá conter duas ou mais isoenzimas diferentes, não indicando a real variabilidade.

Quando se usa dados de eletroforese de isoenzimas para estimar a variabilidade genética de populações naturais, deve-se supor que a amostra representa a população e que os locos analisados representam o genoma (Solferini e Selivon, 2001). Os dados eletroforéticos são um reflexo do DNA e dão uma dimensão da variabilidade genética desta população (Avisé, 1975).

#### **2.4. Variabilidade genética de populações naturais**

Conforme Solé-Cava (2001), o termo diversidade biológica ou biodiversidade compreende, desde a sua origem, a diversidade ecológica e a diversidade genética. A diversidade genética pode ser chamada também de variabilidade genética e pode ser entendida como a diversidade de alelos nos vários locos de uma determinada espécie (Solé-Cava, 2001).

O componente genético da biodiversidade é fundamental, pois é a variação genética que fornece o material básico para a seleção natural e, portanto, para a evolução da espécie (Allcock et al., 1995). Pode, ainda, ser usada como instrumento de investigação por ecólogos e sistematas em diversos ramos, como, por exemplo, para verificar afinidades e limites entre as espécies, detectar modos de reprodução e estrutura familiar, estimar níveis de migração e dispersão nas populações e detectar

restos de animais, como conteúdos estomacais e produtos industrializados de animais ameaçados de extinção (Avisé, 1994).

Populações naturais, normalmente, têm altos níveis de variação genética (Nevo, 1978; Solé-Cava e Thorpe, 1991, Ward et al., 1992). Essa variação é introduzida continuamente nas populações por mutação, recombinação, migração de indivíduos de outras populações e é perdida por deriva genética, por endocruzamento e, no caso de genes não neutros, pela maior parte dos tipos de seleção natural (Nei, 1987). Em populações ameaçadas de extinção ou que saíram de um processo de extinção, a perda da variabilidade é uma dos principais problemas (Solé-Cava, 2001).

Para medir a variação genética de uma população, dois parâmetros são bastante utilizados. O primeiro é a heterozigosidade observada ( $H_o$ ), que é a porcentagem média de heterozigotos para vários locos gênicos. O outro é a heterozigosidade média esperada ( $H_e$ ) ou em equilíbrio, que é a proporção de heterozigotos que deveria haver se a população estivesse em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Solé-Cava, 2001).

Em geral, invertebrados apresentam os maiores níveis de polimorfismo do reino animal, com um valor médio de  $H_e = 0,122$  (Ward et al., 1992). Porém, os valores médios de heterozigosidade para *Sitophilus* sp são bem mais baixos e de acordo com os calculados para outros Curculionidae (Grenier et al., 1994).

O número de trabalhos dedicados à variação isoenzimática em Coleoptera, de acordo com Beiras e Petitpierre (1981), não é grande e em *Sitophilus* sp ficou evidente a baixa variabilidade genética em relação a 170 espécies de insetos (Ward et al., 1992).

Segundo Grenier et al. (1994), padrões de esterases podem permitir a distinção das três espécies de *Sitophilus*, *S. oryzae*, *S. zeamais* e *S. granarius* e *S. oryzae* e *S. zeamais* estão mais próximos entre si que *S. granarius*. Apesar dos poucos locos analisados nas três espécies de *Sitophilus*, parece evidente que essas pragas mostraram baixa variabilidade genética, pelo menos, para alozimas. A heterozigosidade média por indivíduo foi 0,061, 0,067 e 0,029, respectivamente. Estes valores estão bem abaixo da heterozigosidade média calculada para 370 espécies de invertebrados, 0,122 (Ward et al. 1992). As comparações feitas por Beiras e Petitpierre, (1981) entre as três espécies, utilizando os dados

isoenzimáticos indicam maior similaridade genética entre *S. oryzae* e *S. zeamais* ( $I = 0,42$ ), do que entre ambos os outros e *S. granarius* ( $I = 0,11$ ).

O grau de similaridade genética entre as duas espécies de *Sitophilus*, *S. oryzae* e *S. zeamais* é próximo ao grau de similaridade,  $I = 0,47$ , encontrados em espécies crípticas do grupo da *Drosophila obscura* e não é muito diferente daquela encontrada em espécies crípticas do grupo *D. willistoni*,  $I = 0,52$ . Já a similaridade genética entre *S. granarius* e qualquer uma das outras duas espécies também está em paralelo com o relatado em espécies de *D. havaiana*,  $I = 0,16$ , pertencentes a diferentes grupos ou subgrupos. Assim, há uma estreita correspondência entre morfologia e semelhança alozimática em *Sitophilus* ao nível de semelhanças interespecíficas alozimáticas também próximos aos obtidos entre as diferentes espécies de *Drosophila* (Beiras e Petitpierre, 1981).

Suomalainen e Saura (1973) usaram eletroforese em gel de amido para estudar a espécie *Otiorrhynchus scuber* de diferentes populações poliplóides, coletados na Áustria, Suíça, Finlândia, dentre outras regiões. Foram detectados 25 locos com uma heterozigosidade média de 0,309. Pesquisaram também a espécie de *Strophosomus capitatus* de três populações diferentes, que mostraram uma heterozigosidade média de 0,170 em sete locos encontrados.

Nos estudos de Laing et al. (1976), com 900 besouros *Ptomaphagus hirtus* de oito cavernas, representando seis populações, no centro-sul de Kentucky, nos Estados Unidos, foi realizado eletroforese em gel de poliacrilamida e os seguintes sistemas isoenzimáticos foram analisados: malato desidrogenase (MDH), fosfatase ácida (ACP), fosfatase alcalina (ALP), esterase (EST), anidrase carbônica (CA), fosfoglucomutase (PGM), glucoquinase (GLK), oxidase indofenol (IPO), D (-), 3-hidroxi-butirato desidrogenase (HBDH), glucophosphoisomerase (GP1), desidrogenase octanol (ODH), enzima málica (ME). Foram detectados 13 locos isoenzimáticos, com uma média de 1,21 alelos por loco. A porcentagem de locos polimórficos variou de 7,7% a 23,1%. A heterozigosidade média observada foi de 0,048 e a heterozigosidade média esperada foi 0,056, mostrando baixa variabilidade genética para os locos isoenzimáticos. Esta variabilidade foi apenas cerca de metade da maioria dos organismos e cerca de um terço da maioria dos invertebrados.

Martins et al. (2007) avaliaram a diversidade genética do coleóptero *Anthonomus grandis* em sete populações de cinco diferentes regiões do Brasil

produtoras de algodão. Estudou 25 locos RAPD e seis locos isoenzimáticos. O RAPD mostrou um polimorfismo que variou entre 52-84% e uma heterozigosidade de 0,189-0,347. A análise de isoenzimas mostrou um polimorfismo variando de 25 a 100% e a média da heterozigosidade observada foi de 0,212. A diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) obtida entre as populações através de dados isoenzimáticos foi 0,544 ( $P < 0,05$ ). A distância genética (Nei, 1972) variou de 0,239 a 1,00. Foi possível observar alelos raros nas populações da região Nordeste. Os marcadores examinados permitiu aos autores distinguir populações de grande escala na intensiva região agrícola (cintos de algodão), versus populações de agricultura de áreas de pequena escala.



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Coleta e armazenamento**

Foram coletadas amostras de *Sitophilus oryzae* de três localidades diferentes. A primeira amostra, da cidade de Floresta, município próximo a Maringá, interior do Paraná, foi coletada de um pacote de arroz que estava em um mercado da cidade e levada para o laboratório da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e foi mantida por aproximadamente um ano até as análises deste trabalho. A segunda amostra, do município de Xavantina, em Santa Catarina, foi coletada de um armazém onde havia sacos de grãos de milho. Esta amostra foi levada à Universidade Estadual de Maringá (UEM) e a análise se iniciou imediatamente. Finalmente, a terceira amostra, do município de Passo Fundo, no Rio Grande do Sul, coletada de grãos de trigo que estavam armazenados na Embrapa Trigo e estavam sendo replicados por três anos, foi enviada à UEM e logo em seguida foi feita a eletroforese. As amostras foram acondicionadas vivas em uma sala, com temperatura controlada.

Foram utilizados 76 indivíduos da amostra do Paraná, 56 indivíduos da amostra de Santa Catarina e 56 indivíduos da amostra do Rio Grande do Sul.

#### **3.2. Preparação dos extratos**

Para extração, foi utilizado o tampão Tris/HCl 0,1M, pH 7,5. Cada inseto foi colocado em um tubo plástico de 1,5 mL (Eppendorf) com 30µL de tampão de extração, Tris/HCl 0,1M, pH 7,5 e macerado para extrair as enzimas. Logo após, acrescentou-se cinco gotículas de tetracloreto de carbono para precipitar a gordura no extrato (Pasteur et al., 1988). Em seguida, os tubos foram centrifugados em centrífuga refrigerada modelo Mickro 220Rd a Hettich, numa rotação de 19.0064,136g, a 4°C, durante 15 minutos.

#### **3.3. Separação eletroforética**

Para a separação eletroforética das enzimas, foi utilizado o gel de amido como suporte com ação de um campo elétrico. A separação foi realizada por meio de cubas horizontais.

### **3.3.1. Gel de amido**

A preparação do gel de amido foi realizada aproximadamente quatro horas antes da aplicação da amostra para a corrida eletroforética com amido penetrose 50.

Preparou-se géis de amido a 17% em solução tampão. Para revelar seis enzimas, utilizou-se 52g de amido penetrose 50, 315ml de água destilada e 35ml de tampão; para revelar quatro enzimas, utilizou-se 37g de amido penetrose 50, 215ml água destilada e 25ml de tampão.

No presente estudo, foram testados cinco tampões diferentes, TC 7,0; TC 7,6; TEM 7,4; (Shaw e Prasad, 1970), TM (Murphy et al., 1996) sem EDTA e TC 8,0 (Pasteur et al.1988), porém dois deles foram usados mais frequentemente, o TC 7,6 e o TEM 7,4, pois foram os que deram melhores resultados.

As enzimas AAT, GDH, IDH e PGM aparecem com mais nitidez no gel de amido quando é utilizado o tampão TEM 7,4. As enzimas ACP, GPI, MDH e ME, aparecem mais claramente quando é usado o tampão TC 7,6 para fazer o gel de amido.

Para o preparo do tampão TC 7,0, foi utilizado: Tris 0,35 M; ácido cítrico 0,043M. Para o tampão TC 7,6, utilizava-se: Tris 0,1 M e ácido cítrico 0,028M. O tampão TC 8,0 (Pasteur et al. 1988) foi feito com: Tris 0,62 M, ácido cítrico 0,14M, diluído na proporção 1/29 para o gel. O tampão TEM 7,4 foi preparado com: Tris 0,1 M; Ácido Maleico 0,1M, EDTA 0,01M, cloreto de magnésio 0,01M. O tampão TM foi feito com: Tris 0,1 M, Ácido Maleico 0,1M e água destilada até 1000ml.

Dissolveu-se o amido na solução tampão de 17% do tampão escolhido, em um frasco Erlenmeyer, levando ao fogo agitando até ficar mais denso. Em seguida, verteu-se o gel numa placa de vidro pré-aquecida em estufa e foi deixado para resfriar em temperatura ambiente e posteriormente colocado na geladeira até a hora da aplicação das amostras.

### **3.3.2. Corrida eletroforética**

Imediatamente após a centrifugação, as amostras foram aplicadas no gel para a corrida eletroforética. Para isso, utilizou-se pequenas tiras de papel Whatmann 3MM que eram submersas no extrato proteico (sobrenadante). Essas tiras de papel, já com o conteúdo, eram colocadas no gel em um corte paralelo feito aproximadamente 3 cm da borda do gel.

Em seguida, colocou-se a placa com o gel sobre uma cuba horizontal de corrida que continha o mesmo tampão usado para fazer o gel. Na cuba, havia duas pontes, neste caso, pano multiuso, previamente molhado com o mesmo tampão, e colocado nas bordas do gel, criando assim uma ligação entre o gel e o tampão.

Colocou-se a cuba com o gel na geladeira e sobre a cuba um recipiente contendo gelo. Logo após, ligou-se a cuba a uma fonte de energia com voltagem de 250 a 300 V e amperagem de 30 a 40 mA, durante um período de 17 horas, durante a noite, de acordo com Alfenas (2006).

No dia seguinte, após o termino da corrida, o gel foi cortado em fatias com auxílio de uma linha do tipo usado em costura. Essas fatias foram colocadas em recipientes próprios para a revelação.

### **3.4. Revelação e conservação do gel**

A revelação resume-se na incubação do gel em uma mistura formada por um tampão, substrato da enzima, cofatores e corante, chamada de solução histoquímica, específica para cada sistema, preparada segundo Murphy et al. (1996). Na maioria dos casos, o corante precipita ou muda de cor na presença de um produto da reação enzimática.

Em seguida à revelação, que pode ser rápida ou demorar de duas a três horas, retirou-se o gel dessa solução de revelação e fixou-o em uma mistura de 30 ml aproximadamente de álcool metílico, água destilada e ácido acético numa proporção de 5:5:1. Depois de fixado, o gel foi colocado em uma nova placa de vidro para ser fotografado e embrulhado com filme plástico para ser guardado na geladeira para posteriores análises.

### **3.5. Interpretação genética**

O gel, depois da coloração, pode apresentar uma ou mais zonas de atividades que representam a enzima estudada, que representa diferentes formas de uma enzima.

Nos géis, todos os indivíduos podem apresentar uma única banda com a mesma mobilidade, indicando, neste caso, a existência de um só gene ou um loco invariável. Quando existirem várias bandas, a determinação dos genótipos é simples uma vez que as proteínas são codificadas por locos individuais e seus produtos

alélicos são codominantes. A ausência de dominância nos permite identificar os heterozigotos sem a necessidade de realizar cruzamentos. Isto torna a técnica de isozimas uma poderosa ferramenta para o estudo de populações. Os homozigotos apresentam uma única banda e os heterozigotos duas ou mais, dependendo a estrutura da enzima: aquelas formadas por uma unidade polipeptídica são denominadas monoméricas, duas subunidades diméricas, e assim por diante. Para interpretar os géis geneticamente, foram consideradas as estruturas terciárias e quaternárias das enzimas, conforme Ward et al. (1992)

A interpretação genética foi baseada na estrutura quaternária das enzimas segundo Ward et al. (1992). Todas as estimativas estatísticas foram calculadas usando o programa Pop gene 1.31 (Yeh et al., 1997), tais como: variabilidade genética estimada pelo cálculo da heterozigosidade ( $H_e$  e  $H_o$ ), de acordo com Nei (1978), as estatística F ( $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  e  $F_{ST}$ ), de Wright (1978), os valores das frequências alélicas, a identidade (I) e a distância genética (D) de Nei (1972).

Quadro 1 – Nome, número de comissão de enzima (nº. E.C.) e estrutura quaternária (E.Q.) das enzimas analisadas em gel de amido

Enzima (Abreviação)	nº. E. C.	E.Q.
Aspartato amino transferase (Aat)	2.6.1.1	Dimérica
Fosfatase ácida (Acp)	3.1.3.2	Monomérica
Glicose desidrogenase (Gdh)	1.1.1.118	Monomérica
Glicose 6 - fosfato isomerase (Gpi)	5.3.1.9	Dimérica
Isocitrato desidrogenase (ldh)	1.1.1.14	Dimérica
Malato desidrogenase (Mdh)	1.1.1.37	Dimérica
Enzima málica (Me)	1.1.1.40	Tetramérica
Fosfoglucomutase (Pgm)	5.4.2.2	Monomérica

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de eletroforese de 8 sistemas isoenzimáticos de três amostras de *Sitophilus oryzae* resultou na detecção de 10 locos e 18 alelos. Os sistemas analisados foram Aspartato amino transferase (AAT), Fosfatase ácida (ACP), Glicose desidrogenase (GDH), Glicose 6 fosfato isomerase (GPI), Isocitrato desidrogenase (IDH), Malato desidrogenase (MDH), Enzima málica (ME) e Fosfoglicomutase (PGM). Os locos detectados foram: *Aat*, *Acp*, *Gdh*, *Gpi*, *Idh*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Me* e *Pgm*.

A expressão enzimática dos alelos detectados está representada nos zimogramas ilustrados pela Figura 2. Observa-se que o alelo *a* para os locos *Acp*, *Gdh*, *Idh*, e *Me* estiveram presentes nas três amostras. O alelo *b* para o loco *Aat* esteve presente nas três amostras e todos os alelos dos locos *Mdh-2* e *Mdh-3* estiveram presentes também nas três amostras. Nessa figura, é possível observar também que na amostra do Paraná sete sistemas isoenzimáticos (*Aat*, *Acp*, *Gdh*, *Idh*, *Me*, *Mdh-2* e *Mdh-3*) revelaram todos os alelos dos locos dos sistemas enzimáticos analisados, representando a amostra com maior frequência de alelos comparada com as duas amostras estudadas. Dentre os locos visualizados, as enzimas MDH e PGM apresentaram um maior número de alelos por loco (quatro), enquanto as enzimas GDH, IDH e ME tiveram um menor número de alelo por loco (1 alelo).

A observação das frequências alélicas permitiu ainda identificar quatro alelos exclusivos na amostra de SC e dois alelos exclusivos na amostra do PR. Os alelos exclusivos encontrados na amostra de SC foram *Gpi* (*b*), *Mdh-1* (*a*), *Pgm* (*a*) e *Pgm* (*b*) com frequências de 1,0000, 1,0000, 0,0375 e 0,9625, respectivamente, enquanto na amostra do PR os alelos exclusivos encontrados foram *Aat* (*c*) e *Pgm* (*d*), com frequências de 0,0568 e 0,0132. Dos seis alelos exclusivos, o alelo *Pgm* (*d*), com frequências de 0,0132, na amostra do PR, pode ser considerado ainda como um alelo raro, devido a sua baixa frequência. Os demais alelos exclusivos apresentam uma frequência considerada elevada. Nesta situação, tais frequências poderiam ser indicadas como um marcador genético para tais amostras.

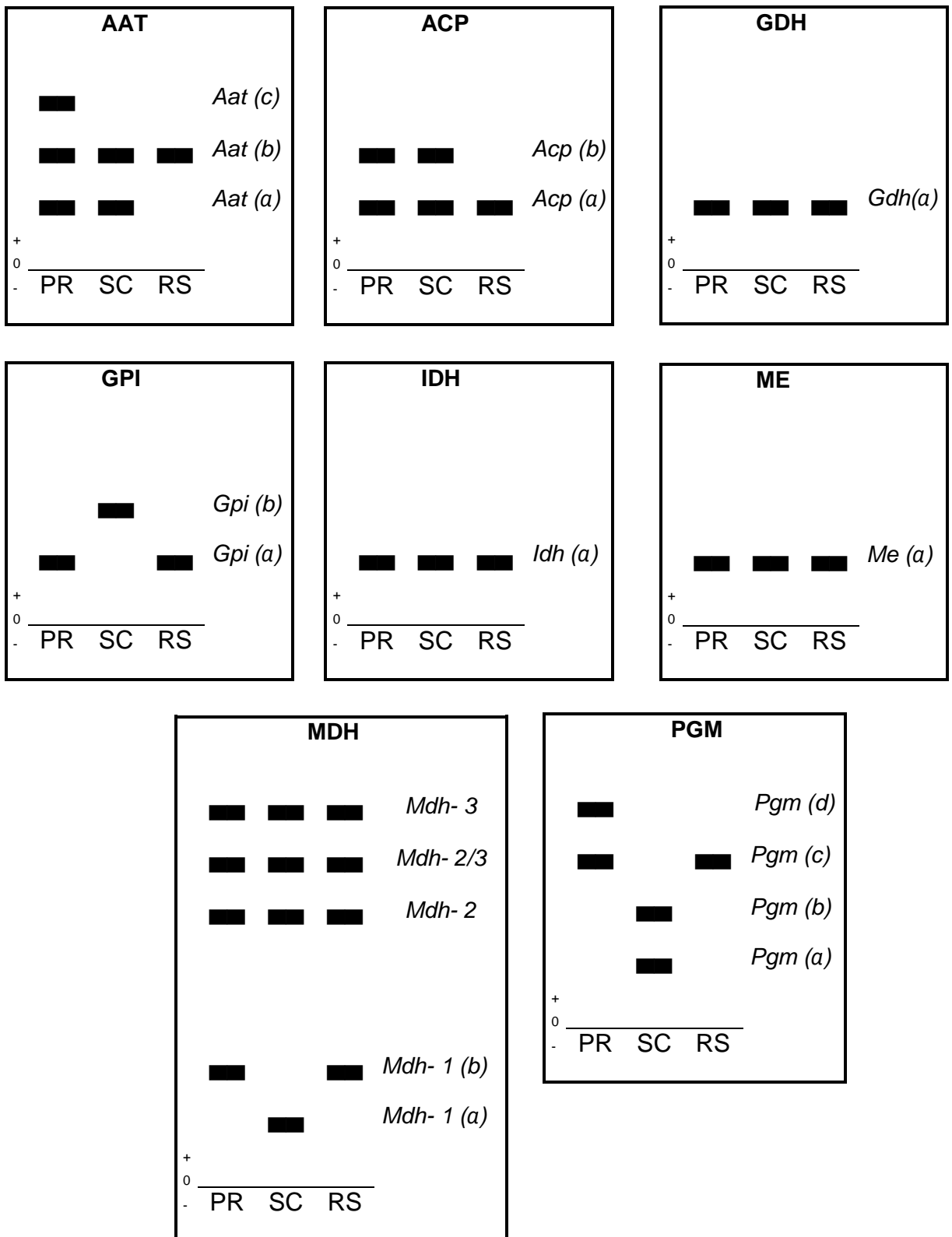


Figura 2- Zimograma simbolizando o padrão de bandas dos 8 sistemas isoenzimáticos analisados em gel de amido, com os seus respectivos alelos, presentes nas amostras (amostra do município de Floresta -PR; amostra do município de Xavantina - SC; amostra do município de Passo Fundo - RS).

O Quadro 2 exibe as frequências alélicas em cada loco em cada amostra analisada. Na amostra do Paraná, apenas os locos *Aat*, *Acp* e *Pgm* apresentaram variação alélica, com três, dois e dois alelos, respectivamente. Na amostra de Santa Catarina, somente os locos *Aat*, *Acp* e *Pgm* apresentaram variação, com dois alelos cada um. E por fim, na amostra de Passo Fundo, nenhum dos locos apresentou variação alélica. Dos locos polimórficos, apenas *Pgm* da amostra de santa Catarina está em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Quadro 2 - Frequência dos alelos nas 3 amostras de *Sitophilus oryzae*: amostra do município de Floresta – PR; amostra do município de Xavantina – SC; amostra do município de Passo Fundo – RS

Loco	Alelo	PR	SC	RS
<i>Aat</i>	<i>a</i>	0,0568	0,2125	-
	<i>b</i>	0,8864	0,7875	1,0000
	<i>c</i>	0,0568	-	-
<i>Acp</i>	<i>a</i>	0,1000	0,0200	-
	<i>b</i>	0,9000	0,9800	1,0000
<i>Gdh</i>	<i>a</i>	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Gpi</i>	<i>a</i>	1,0000	-	1,0000
	<i>b</i>	-	1,0000	-
<i>Idh</i>	<i>a</i>	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Mdh-1</i>	<i>a</i>	-	1,0000	-
	<i>b</i>	1,0000	-	1,0000
<i>Mdh-2</i>	<i>a</i>	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Mdh-3</i>	<i>a</i>	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Me</i>	<i>a</i>	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Pgm</i>	<i>a</i>	-	0,0375	-
	<i>b</i>	-	0,9625	-
	<i>c</i>	0,9868	-	1,0000
	<i>d</i>	0,0132	-	-

As estimativas das frequências alélicas, mostradas no Quadro 2, foram utilizadas no teste do qui quadrado de homogeneidade, que demonstraram a diferenciação entre as amostras. Neste estudo, dos 10 locos analisados em todas as amostras, metade apresentaram frequências alélicas diferentes ( $p < 0,05$ ) *Aat*, *Acp*,

*Gpi*, *Mdh-1* e *Pgm* e a outra metade, *Gdh*, *Idh*, *Mdh-2*, *Mdh-3* e *Me*, apresentou frequências alélicas semelhantes ( $p > 0,05$ ).

Quadro 3 - Medidas de variabilidade genética: He: heterozigosidade esperada; Ho: heterozigosidade observada; P%: proporção de locos polimórficos; K: número de alelos por loco

População	He $\pm$ DP	Ho $\pm$ DP	P%	K $\pm$ DP	F
PR	0,0419 $\pm$ 0,0821	0,0091 $\pm$ 0,0287	30%	1,4000 $\pm$ 0,6992	0,7828
SC	0,0452 $\pm$ 0,1061	0,0100 $\pm$ 0,0242	30%	1,3000 $\pm$ 0,4830	0,7787
RS	0,0000 $\pm$ 0,0000	0,0000 $\pm$ 0,0000	0%	1,0000 $\pm$ 0,0000	0,0000

A porcentagem de locos polimórficos foi de 30% na amostra do PR, 30% na amostra de SC e a amostra do RS não apresentou polimorfismo. Nos estudos realizados por Beiras e Petitpierre (1981), a proporção de locos polimórficos foi de 14% para *S. oryzae*, 16% para *S. zeamais* e 10% para *S. granarius*. De acordo com Grenier et al. (1994), a porcentagem de locos polimórficos foi de 62% em *S. oryzae*, 89% em *S. zeamais* e 67% em *S. granarius*. A diferença de porcentagem de locos polimórficos se deve ao fato de que Beiras e Petitpierre (1981) analisaram seis locos de várias enzimas. Em contrapartida, Grenier et al. (1994) analisaram apenas três locos de Esterase. Nos trabalhos de Laing et al. (1976), analisando 13 locos isoenzimáticos em *Ptomaphagus hirtus*, a porcentagem de locos polimórficos variou de 7,7% a 23,1%, sendo que ele.

Quanto ao número médio de alelos por loco, verificou-se uma variação de 1,4 a 1,0, sendo o maior número de alelos encontrado na amostra do PR e o menor na amostra do RS, que apresenta apenas um alelo para cada loco, portanto todos monomórficos. Estudos realizados por Grenier et al. (1994) mostraram que o número médio de alelos por loco é 1,90 em *S. oryzae*, 2,48 em *S. zeamais* e 1,67 em *S. granarius*. Em besouros *Ptomaphagus hirtus*, foi encontrada uma média de 1,21 alelos por loco conforme Laing et al. (1976)

Segundo Laing et al. (1976), a baixa variabilidade genética para locos isoenzimáticos de um tipo de besouro da caverna, *Ptomaphagus hirtus* (Leiodidae), foi um terço menor que a maioria dos invertebrados, um fato que provavelmente poderia ser atribuído à constância ambiental e uniformidade de habitats. A baixa



variabilidade genética encontrada em *Sitophilus* não tem paralelo com outras espécies de gorgulhos, uma vez que duas raças bi-sexuais de *Strophosomus capitatus* e *Otiorrhynchus scaber* têm heterozigosidade de 0,170 e 0,309, respectivamente (Suomalainen e Saura, 1973), claramente superiores aos de *Sitophilus*: 0,061; 0,067 e 0,029: *S. oryzae*, *S. zeamais* e *S. granarius*, respectivamente (Beiras e Petitpierre, 1981).

Neste estudo, as heterozigosidades médias esperadas para as espécies de *S. oryzae* é de 0,0419 para a amostra do PR; 0,0452 para a amostra de SC e de 0,0000 para a amostra do RS (conforme dados do Quadro 3), ficando evidente que essas pragas mostraram uma baixa variabilidade genética para alozimas quando comparadas com o estudo realizado por Ward et al. (1992), que indicou a heterozigosidade média num valor de 0,137 para insetos. A maior heterozigosidade média observada foi a da amostra de SC, seguido pela amostra do PR, valores estes bem próximos, porém bem distantes do esperado para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (E.H W).

Quadro 4 - Comparação dos valores de He: heterozigosidade esperada, das amostras do PR, SC, RS e de 170 espécies de insetos (Ward et al.,1992)

Loco	He - PR	He - SC	He - RS	He - Insetos
Aat	0,2103	0,3389	0,0000	0,134
Acp	0,1823	0,0396	0,0000	0,199
Gdh	0,0000	0,0000	0,0000	0,126
Gpi	0,0000	0,0000	0,0000	0,229
Idh	0,0000	0,0000	0,0000	0,124
Pgm	0,0261	0,0731	0,0000	0,274
Mdh-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,063*
Mdh-2	0,0000	0,0000	0,0000	-
Mdh-3	0,0000	0,0000	0,0000	-
Me	0,0000	0,0000	0,0000	0,095
Média	0,0419	0,0452	0,0000	0,137

\* Valor referente à enzima MDH.

Comparativamente, observou-se que os valores encontrados neste trabalho foram abaixo da média encontrada em outras espécies de invertebrados e nas três espécies de *Sitophilus*, como citado por Beiras e Petitpierre (1981), e também abaixo da média encontrada em insetos citado por Ward et al. (1992).

As amostras do PR e de SC (Quadro 4) diferem nas frequências alélicas dos locos *Aat*, *Acp* e *Pgm*. A heterozigosidade esperada somente para o loco *Aat* das amostras do Paraná e de Santa Catarina é maior do que a heterozigosidade esperada para o mesmo loco em insetos (Ward et al., 1992). Por outro lado, para os locos *Acp* e *Pgm* das amostras do PR e de SC a heterozigosidade esperada é menor do que a heterozigosidade esperada para o mesmo loco em insetos (Ward et al., 1992). Porém, os demais locos das amostras do Paraná e de Santa Catarina e todos os locos da amostra do Rio Grande do Sul não apresentaram variabilidade, sendo todos indivíduos homozigotos. O loco *Pgm* da amostra de SC está em Equilíbrio de H-W.

A baixa heterozigosidade estimada para *S. oryzae* em relação à média para insetos em geral (Ward et al., 1992) e para outras espécies de *Sitophilus* (Grenier et al., 1994), provavelmente, se deve ao fato de que estas populações foram iniciadas por poucos fundadores que contêm poucos alelos (princípio do fundador). Depois que a população se expande numericamente conserva uma baixa diversidade genética.

O Quadro 5 mostra os valores de estatísticas F de Wright (1978). Segundo Wright (1978), quando a média dos valores de  $F_{IS}$  e  $F_{IT}$  apresenta valores positivos, representa excesso de indivíduos homozigotos nas subpopulações e na população total, respectivamente, enquanto os valores resultantes de  $F_{ST}$  medem o grau de diferenciação entre as populações. Valores até 0,05 refletem uma baixa diferenciação das populações; valores entre 0,05 e 0,15 indicam uma diferenciação moderada das populações; entre 0,15 e 0,25 mostram uma diferenciação populacional alta e os valores acima de 0,25 refletem diferenciação muito alta.

Observou-se que o valor médio positivo do índice de fixação  $F_{IS}$  (0,7906) e o valor de  $F_{IT}$  (0,9612) para as três amostras de *S. oryzae* confirma também o excesso de indivíduos homozigotos. O valor da média obtida para  $F_{ST} = 0,8145$  indicou que as três amostras de *S. oryzae* analisadas são bastante diferentes geneticamente.

Os alelos exclusivos, observados nas amostras de *S. oryzae* do Paraná e Santa Catarina analisadas aqui, demonstraram que as altas frequências desses

alelos, com exceção do alelo *Pgm* (*d*) presente na amostra do PR, que obteve menor frequência, podem estar sendo rapidamente fixados nestas populações. De acordo com Thorpe e Solé-Cava (1994), novos alelos aparecerão inicialmente em frequências baixas na população e o destino evolutivo dos novos alelos dependerá de seu desempenho fisiológico relativo (valor adaptativo ou valor seletivo) e de mudanças casuais da frequência, quando transmitido para gerações seguintes. Portanto, a provável razão da presença desses alelos exclusivos pode ser mais provavelmente o isolamento das populações ou, ainda, a ocorrência de mutações em regiões do DNA que codificam uma determinada enzima que, em condições eletroforéticas, pode diferenciar indicando um novo alelo, o qual devido à mutação tem frequência muito baixa e não elevada. O aumento rápido na frequência se deve à seleção natural ou deriva genética. Alelos exclusivos podem servir como marcadores moleculares da espécie, o que ajudará na sua identificação.

Quadro 5 – Resumo da estatística F para três amostras de *S. oryzae*.

Loco	N	F <sub>IS</sub>	F <sub>IT</sub>	F <sub>ST</sub>
Aat	124	0,7864	0,8041	0,0828
Acp	122	1,0000	1,0000	0,0486
Gdh	120	-	-	0,0000
Gpi	120	-	1,0000	1,0000
Idh	120	-	-	0,0000
Pgm	168	0,2359	0,9454	0,9286
Mdh-1	180	-	1,0000	1,0000
Mdh-2	180	-	-	0,0000
Mdh-3	180	-	-	0,0000
Me	120	-	-	0,0000
Média	143	0,7906	0,9612	0,8145

n: tamanho da amostra.

A identidade genética (I) é uma das formas de se verificar se duas populações são ou não da mesma espécie. Nei (1972, 1978) produziu estatísticas para calcular a identidade e distância genética entre duas populações. Thorpe e

Solé-Cava (1994) utilizaram valores de identidade genética de Nei (1972) para a análise de populações alopátricas, abrangendo populações da mesma espécie, do mesmo gênero, mas de espécies diferentes e espécies de gêneros diferentes. De acordo com estes autores, o índice de similaridade genética de Nei (1978) entre duas populações da mesma espécie varia entre 0,85 e 1,00 e entre duas espécies do mesmo gênero varia entre 0,35 e 0,85. Assim, se a similaridade genética entre duas unidades taxonômicas é inferior a 0,85, seguramente, são duas espécies distintas; se for inferior a 0,35 devem ser consideradas como espécies pertencentes a gêneros diferentes.

Quadro 6 - Valores de identidade genética (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) de Nei (1978) para três amostras de *S. oryzae*

Pop ID	PR	SC	RS
PR	-	0,6892	0,9983
SC	0,3722	-	0,6925
RS	0,0017	0,3675	-

De acordo com os dados do Quadro 6, os valores para identidade genética mostram que entre as amostras do PR e SC  $I = 0,6892$ , entre PR e RS  $I = 0,9983$  e entre SC e RS  $I = 0,6925$ , levam à conclusão de que as amostras do PR e RS são da mesma espécie e isso não se nota entre as amostras de SC e PR e entre as amostras de SC e RS. O trabalho de Beiras e Petitpierre (1981) mostrou:  $I = 0,42$  entre *S. oryzae* e *S. zeamais* e  $I = 0,11$  entre *S. granarius* e essas duas espécies.

Os valores da distância genética de Nei (1978) entre PR e SC (0,3722) e entre RS e SC (0,3675) indicam que aproximadamente 37% dos códons que codificam aminoácidos foram substituídos durante o processo de divergência entre a amostra de SC e as outras duas e apenas 0,17% dos códons foram substituídos entre as amostras de SC e RS.

Segundo Thorpe e Solé-Cava (1994), em populações simpátricas, variação significativa em qualquer loco representa uma barreira ao fluxo gênico e, no mínimo, isolamento reprodutivo parcial. Em organismos que têm reprodução sexual por fecundação cruzada, esta variação indica que duas populações deveriam ser consideradas como espécies diferentes. Assim, pode-se dizer que não foram encontradas diferenças significativas entre as duas populações e a ausência de um

loco diagnóstico nos leva a concluir que não existem mecanismos genéticos de isolamento reprodutivo e, portanto, as duas populações correspondem à mesma espécie.

Uma possível explicação para a baixa frequência de polimorfismo de *S. oryzae* em relação a outras espécies, tanto de *S. zeamais* quanto de outros gorgulhos da família Curculionidae, é o fato de que as amostras analisadas procedem de linhagens que provavelmente foram derivadas de um número muito pequeno de indivíduos, ou da mesma progênie.

A seleção natural e a deriva genética podem ter desempenhado um papel essencial na fixação aleatória de alelos e a constância ambiental do *Sitophilus* em armazéns de grãos ou em laboratório, o que pode favorecer também as semelhanças das características genéticas.

O estudo das estruturas populacionais por meio de técnicas moleculares talvez seja a parte mais importante da genética da conservação e tem sido útil tanto no estudo de populações exploradas comercialmente (abundantes, mas com riscos populacionais devido à superexploração), como nas espécies já ameaçadas de extinção (Solé-Cava, 2001).

## 5. CONCLUSÕES

a) As amostras estudadas no presente trabalho apresentaram pouca variabilidade genética, evidenciada pelos baixos valores de  $H_e$ .

b) A amostra de Santa Catarina é diferente das amostras do Paraná e do Rio Grande do Sul.

c) Pelo critério de Thorpe e Solé-Cava (1994), a amostra de Santa Catarina poderia ser considerada uma espécie diferente de *S. oryzae*.

d) A baixa variabilidade genética detectada no presente trabalho pode ser devida ao fato de que as amostras analisadas procedem de linhagens que provavelmente foram derivadas de um número muito pequeno de indivíduos ou da mesma progênie.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 2006. 627p.
- ALLCOCK, A.L.; CHAUVET, M.; CRANDALL, K.A.; GIVEN, D.R.; HALL, S.J.G.; IRIONDO, J.M.; LEWINSOHN, T.M.; LYNCH, S.M.; SOLÉ-CAVA, A.M.; STACKEBRANDT, E.; TEMPLETON, A.R.; WATTS, P.C. Genetic diversity as a component of biodiversity. In: HEYWOOD, V.H.; WATSON, R.T. (eds.). **Global Biodiversity Assessment**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p. 57-88.
- ALMEIDA, A.A. Natureza dos danos causados por insetos em grãos armazenados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA. Campinas, 1987. **Resumos...** Campinas: Fundação Cargill, 1989, p. 16-32.
- ATHIÉ, I.; PAULA, D.C. **Insetos de grãos armazenados: aspecto biológico e identificação**. São Paulo: Livraria Varela, 2002. 238p.
- AVISE, J.C. Systematic value of electrophoretic data. **Systematic Zoology**, 23:465-481, 1975.
- AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. London: Chapman & Hall, 1994. 493p.
- AZEVEDO, F.A. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Paulo: Rima/Intertox, 2003. 340p.
- BALASUBRAMANIAN, S.P.; COX, A.; BROWN, N.J.; REED, M.W. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **European Journal of Surgical Oncology**, 30:593-601. 2004.
- BEIGUELMAN, B. **Genética de populações humanas**. Ribeirão Preto: SBG, 2008. 239p.
- BEIRAS, M.J.; PETITPIERRE, E. Allozymic Variability and Genetic Differentiation in Three Species of *Sitophilus L.* (Coleoptera, Curculionidae). **Egyptian Journal of Genetics and Cytology**, 10:95-104, 1981.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Folha de Viçosa, 2009. 531p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. **Perdas na agropecuária brasileira; relatório preliminar da Comissão Técnica para Redução das Perdas na Agropecuária - 1993**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 15, maio, 2011.

BREWER, G.J.; SING, C.F. **An introduction to isozyme techniques**. New York: Academic Press, 1970. 86p.

BROWN, A.D.H. Isozymes, plant population, genetic structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, 52:45-147, 1978.

CASTRO, A.P. **Perspectivas da utilização do gene bt para o controle de insetos-praga do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2008. 43p.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo primeiro levantamento, agosto, 2011**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>. Acesso: 25, Janeiro, 2012.

CONKLE, MT.; HODGSKISS, P.D.; NUNNALLY, L.B.; HUNTER, S.C. **Start gel electrophoresis of conifer seed: a laboratory manual**. Berkeley: CA, USDA, Forest Service, 1982.18p.

COSTA, M.A.G.; COSTA, E.C. **Poluição ambiental: herança para gerações futuras**. Santa Maria: Orium, 2004. 256p.

EMBRAPA. **Manejo Integrado de pragas de grãos armazenados**. Disponível em: [http://www.cnpt.embrapa.br/pesquisa/entomologia/mip\\_sitoph.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/pesquisa/entomologia/mip_sitoph.htm). Acesso em: 29, junho, 2011.

EVANS, D.E. The biology of stored products Coleoptera. In: CHAM, B.R.; HIGHLEY, E. (eds.). **Proceedings of the Australian Development Assistance Course on the Preservation of Stored Cereals**. Canberra: CSIRO Division of Entomology, 1981. p. 149-185.



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

FORD, E.B. **Ecological genetics**. London: Chapman and Hall, 1975. 442p.

FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 646p.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D. **Manual de Entomologia Agrícola**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1988. 649p.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, FEALQ, 2002. 920p.

GRENIER, A.M.; PINTUREAU, B.; NARDON, P. Enzymatic variability in 3 species of *Sitophilus* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, 30:201-213, 1994.

HICKMAN JR. C.P.; ROBERTS, L.S.; LARSON, A. **Princípios integrados de zoologia**. Rio de Janeiro: Koogan, 2004. 839p.

HUNTER, R.L.; MARKERT, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. **Science**, 125:1294-1295, 1957.

KIM, K.S.; CANO-RIOS, P.; SAPPINGTON, T.W. Using genetic markers and population assignment techniques to infer origin of boll weevils (Coleoptera: Curculionidae) unexpectedly captured near on eradication zone in Mexico. **Environmental Entomology**, 35:813-826, 2006.

LAING, C.; CARMODY, G.R.; PECK, S.B. Population genetics and evolutionary biology of the cave beetle *Ptomaphagus hirtus*. **Evolution**, 30:484-498, 1976.

LARA, M.A.C. **Variabilidade genética em bovinos e bubalinos a través de polimorfismos protéicos: análise populacional e suas implicações no melhoramento**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 1998. 215p. Tese (Doutorado em Genética).

LARA, M.A.C.; SERENO, J.R.; ABREU, U.G.P.; SERENO, F.T.P.S.; CONTEL, E.P.B. Estudio preliminar de relaciones genéticas entre razas naturalizadas brasileñas, cebuínas y europeas. **Archivos de Zootecnia**, 50:165-170, 2001.

LIEWLAKSANEEYANAWIN, C.; RITLAND, C.E.; EL-KASSABY, Y.A. Inheritance of null alleles for microsatellites in the white pine weevil (pissodes strobe [peck] Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Heredity**, 93:67-70, 2002.

MARKET, C.L. Biology of isozymes. In: MARKET, C.L. **Isozymes: molecular structure**. New York: Academic Press, 1975. p. 1-9.

MARQUES, D.K.S. **Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002. 22p.

MARSARO JÚNIOR, A.L. **Enzimas digestivas de insetos**. Disponível em <http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2005/artigo.2005-09-15.5150977748/?searchterm=insetos>. Acesso em: 15, maio, 2011.

MARTINS, W.F.S.; AYRES, C.F.J.; LUCENA, W.A. Genetic diversity of Brazilian natural populations of *Anthonomus grandis* Boheman, the major cotton pest in the new world. **Genetics and Molecular Research**, 6:23-32, 2007.

MORTON, N.E. Forces maintaining polymorphisms. **Acta Anthropogenetica**, 1:3-14, 1976/1977.

MURPHY, R.W.; SITES Jr.; J.W.; BUTH, D.G.; HAUFLE, C.H. Proteins: isozyme electrophoresis. In: HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. (eds.). **Molecular systematics**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. p.51-120.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, 106:283-291, 1972.

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

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512p.

NEVO, E. Genetic variation in natural populations patterns and theory. **Theoretical Population Biology**, 13:121-177, 1978.

PACHECO, I.A.; DE PAULA, D.C. **Insetos de grãos armazenados – Identificação e biologia**. Campinas: Fundação Cargill, 1995. 228p.

PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; BONHOMME, F.; CATALAN, J.; BRITTONDAVIDIAN, J. **Practical isozyme genetics**. Chichester: Ellis Horwood, 1988. 215p.

PEREIRA, P.R.V.S.; SALVADORI, J.R. **Identificação dos principais Coleoptera (Insecta) associados a produtos armazenados**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 33p. html. Disponível em: [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do75.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do75.htm). Acesso em: 25, junho, 2011.

PIERCE, L.C.; BREWBAKER, J.L. Applications of isozyme analysis in horticultural science. **Horticultural Science**, 8:17-22, 1973.

PINTUREAU, B.; GRENIER, A.M.; NARDON, P. polymorphism of esterases in 3 species of *Sitophilus* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, 27:141-151, 1991.

PUZZI, D. **Abastecimento e armazenagem de grãos**. São Paulo: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1986. 1917p.

RIBEIRO-COSTA, C.S.; ROCHA, R.M. **Invertebrados: manual de aulas práticas**. Riberão Preto: Holos, 2006. 285p.

ROCHA A.P.; MAGALHÃES P.K.R.; MAIA, A.L.; MACIEL, M.Z. Polimorfismos no Carcinoma Medular de Tireóide. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. 51:23-37, 2007.

SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plant: a review. **Biochemical Genetics**, 3:37-79, 1969.

SCANDALIOS, J.G. Genes, isozymes and evolution. In: MARKET, C.L. **Isozymes: genetics and evolution**, New York: Academic Press, 4:1-7, 1975.

SHAW, C.R.; PRASAD, R. Starch gel eletrophoresis of enzymes – a compilation of Recifes. **Biochemical Genetics**, 4:297-320, 1970.

SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. **Biochemical Journal**, 6:629-641, 1955.

SOLÉ-CAVA, A.M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S.R. (ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 173-192.

SOLÉ-CAVA, A.M.; THORPE, J.P. High levels of genetic variation in natural populations of marine lower invertebrates. **Biological Journal Linnean Society**, 44:65-80, 1991.

SOLFERINI, V.N.; SELIVON, D. Polimorfismo de isozimas. In: MATIOLI, S.R. (ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 137-142.

STORER, T.I. **Entomologia geral**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2003. 591p.

STRESSER, R. **Pragas**: principais insetos que atacam grãos e outros produtos estocados- *Sitophilus oryzae*. Disponível em: [http:// www.tecnigran.com.br](http://www.tecnigran.com.br). Acesso em: 15, maio, 2010.

SUOMALAINEN, E.; SAURA, A. Genetic polymorphism and evolution in parthenogenic animals. I. Polyploid Curculionidae. **Genetics**, 74:489-508, 1973.

THORPE, J.P. The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. **Annual Review of Ecology Systematic**, 13:139-168, 1982.

THORPE, J.P.; SOLÉ-CAVA, A.M. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. **Zoologica Scripta**, 23:3-18, 1994.

VAN OOSTERHOUT C.; VAN HEUVEN, M.K.; BRAKEFIELD, P.M. On the neutrality of molecular genetic markers: pedigree analysis of genetic variation in fragmented populations. **Molecular Ecology**, 13:1025-1034, 2004.

VIEIRA, N.R.A. **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. 633p.

VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; ANDREI, C.C. **Plantas inseticidas**. São Carlos: EduFSCAR, 2003. 176p.

VITAL, M.V.C.; VIEIRA, L.C.G.; CARVALHO, R.A.; COSTA, D.A.; SILVA, L.C.F.; SILVEIRA, A.V.T.; LIMA FILHO, G.F. Insetos em experimentos de ecologia de populações: um exemplo de abordagem didática. **Acta Scientiarum**, 26:287-290, 2004.

WARD, D.R.; SKIBINSKI, D.O.F.; WOODWARD, M. Protein heterozygosity, protein structure, and taxonomic differentiation. **Evolutionary Biology**, 26:73-159, 1992.

WRIGHT, S. **Evolution and genetics of populations**. Chicago: The University of Chicago Press, 1978. 465p.

YEH, F.C.; YANG, R-C.; BOYLE, TBJ.; YE, Z-H.; MAO, JX. **POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis**. Alberta: University of Alberta, 1997. 448p.