

ESTRUTURA GÉNÉTICA DE POPULAÇÕES NORDESTINAS DE *Rhynchophorus*
palmarum (L.) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

por

CLEANE DE SOUZA SILVA

(Sob Orientação do Professor Valdir de Queiroz Balbino – UFPE)

RESUMO

Entre os insetos descritos na família Curculionidae, dez espécies são classificadas como pertencentes ao gênero *Rhynchophorus*, dentre as quais, sete são consideradas pragas do coqueiro (*Cocos nucifera*) e demais Aarecáceas. Entre estas, destaca-se, pela severidade de danos, a broca-do-olho-do-coqueiro, *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus). Este inseto tem origem americana, e ocorre em todo território brasileiro, infestando pelo menos 12 famílias botânicas. Apesar do reconhecimento dessa espécie como praga, poucos estudos moleculares têm sido documentados a seu respeito, sendo toda a informação destas espécies e de suas populações totalmente baseados em características morfológicas. Estudos genéticos veem possibilitando investigar a diversidade genética entre populações e entre espécies, assim como seu destino evolutivo ao longo do tempo. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo molecular através do marcador molecular COX I de sete populações, distribuídas em quatro estados do nordeste do Brasil e identificadas, primariamente, como *R. palmarum* e analisar a divergência genética existente entre estas populações. Através da reconstrução da filogenia foi detectada a presença de dois clados claramente distintos. Através da rede de haplótipos foi possível detectar a presença de apenas 12 haplótipos onde o haplótipo H1 foi o mais frequente devido a sua presença em 117

indivíduos distribuídos entre seis das sete populações investigadas. Foi possível observar também que o índice de F_{ST} apresentou um alto valor, indicando divergência genética, estimado a partir do parâmetro F_{ST} (0,00- 0,848) quando comparado a população de Fortaleza (CE) com as demais.

PALAVRAS-CHAVE: Inseto, DNA, diversidade.

POPULATION GENETIC STRUCTURE OF THE BRAZILIAN NORTHEAST OF
PALMARUM RHYNCHOPHORUS (L.) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

por

CLEANE DE SOUZA SILVA

(Under the Direction of Professor Valdir de Queiroz Balbino- UFPE)

ABSTRACT

Among the insects described in the Curculionidae family, ten species are classified as belonging to the genus Rhynchophorus, among which seven are considered pests of coconut palm (*Cocos nucifera*) and other Arecáceas. Among these, it stands out the severity of damage, the drill-the-eye-of-coconut tree, *Rhynchophorus Palmarum* (Linnaeus). This insect has American origin, and occurs throughout Brazil, infesting at least 12 plant families. Despite the recognition that species like the plague, few molecular studies have been documented about him, and all the information of these species and their populations fully based on morphological characteristics. Genetic studies see allowing investigate the genetic diversity between populations and between species and their evolutionary destiny over time. In this context, this study aimed to carry out a molecular study by molecular marker COX I seven people, distributed in four states in northeastern Brazil and identified primarily as *R. Palmarum* and analyze the genetic divergence between populations. Through the reconstruction of phylogeny it was detected the presence of two clearly distinct clades. Through the network haplotypes it was possible to detect the presence of only 12 haplotypes where the haplotype H1 is the most common because of its presence in 117 subjects divided in six of the seven populations studied. It was also observed that the F_{ST} index

showed a high value, indicating genetic divergence estimated from F_{ST} parameter (0,00- 0.848) when compared to the population of Fortaleza (CE) with the other.

KEY WORDS: Insect, ADN, diversity.

ESTRUTURA GÉNETICA DE POPULAÇÕES NORDESTINAS DE *Rhynchophorus palmarum* (L.) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

por

CLEANE DE SOUZA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Entomologia Agrícola.

RECIFE - PE

Fevereiro – 2016

ESTRUTURA GÉNÉTICA DE POPULAÇÕES NORDESTINAS DE *Rhynchophorus*
palmarum (L.) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

por

CLEANE DE SOUZA SILVA

Comitê de Orientação:

Valdir de Queiroz Balbino – UFPE

Manoel Guedes Correa Gondim Junior – UFRPE

ESTRUTURA GÉNÉTICA DE POPULAÇÕES NORDESTINAS DE *Rhynchophorus*
palmarum (L.) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

por

CLEANE DE SOUZA SILVA

Orientador: _____
Valdir de Queiroz Balbino – UFPE

Examinadores: _____
Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Jr. – UFPE

DEDICATÓRIA

À Deus, pelo infinito amor concedido em todos os dias da minha vida.

A minha família, em especial a minha mãe Maria Salete, pelo amor, dedicação e valiosos ensinamentos. Sem seu apoio e inspiração, nada seria possível.

Com amor dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por cada dia de minha existência e por sempre colocar pessoas tão especiais a meu lado.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação em Entomologia Agrícola.

À Universidade Federal de Pernambuco que possibilitou desenvolvimento deste trabalho.

Ao corpo docente do Programa de Pós Graduação em Entomologia Agrícola da UFRPE.

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

Ao meu orientador Dr. Valdir de Queiroz Balbino, pela oportunidade, ensinamentos e pelo suporte nesse trabalho.

Ao meu Coorientador Dr. Manoel Guedes Correa Gondim Junior, pela colaboração nas coletas das populações de insetos utilizados nesse trabalho e pelos valiosos ensinamentos, paciência e incentivo.

A pessoa que torna meus dias mais suaves, minha mãe Maria Salete de Souza Silva, pelo amor incondicional, dedicação e apoio em todos os momentos.

As minhas irmãs Clarete Maria da Silva e Ana Cléia Souza Silva, pelo total apoio em cada fase da minha vida e por nunca deixar que a distância tire nossa união.

Aos meus sobrinhos Wemerson Saulo, Antunes e Antônio Felipe, pelo companheirismo e palavras doces de incentivo.

Ao Dr. Wagner Melo (UFC), ao Dr. Eudes Oliveira (EMBRAPA), a Dr^a Elaine Folly Ramos (UFPB) e ao amigo Fernando Silva (University of Amsterdam), pela disponibilidade na coleta de algumas das populações usadas neste trabalho.

A todos os amigos do LABBE (Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva) da UFPE, pelo acolhimento e por cada momento de alegria e companheirismo. Em especial Moisés Freitas, Lidiane Gomes e Kláudia Tenório muito obrigada pela disponibilidade, ajuda e energia positiva na realização deste trabalho.

Aos amigos do mestrado em Entomologia Agrícola 2014.1, Elisabeth Albuquerque, Antônio Almeida, Hilton Nobre, Paulo Duarte, Márcia Mayara e Ingrid Souza por todo carinho e amizade. Nunca me esquecerei dos momentos que passamos juntos!

As amigas do Programa de pós-graduação em Entomologia Agrícola, em especial, Elaine Cristina, Francieli Santos, Vaneska Barbosa, Mauricea Fidelis, Cynara Moura e Amanda Túler, pelos momentos divididos. Vocês se tornaram amigas de uma vida inteira e tornaram mais leve os dias ruins.

A Liliane Eleutério, amiga de todas as horas e desde sempre, pelo apoio e incentivo em cada momento, por me ajudar ouvindo não só angústias e lamentações, mas também alegrias.

A todas as pessoas que participaram da minha vida, direta ou indiretamente, saibam que vocês são de extrema importância para mim.

Obrigada a todos!

SUMÁRIO

	Páginas
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
Broca-do-olho-do-coqueiro, <i>Rhynchophorus palmarum</i>	1
Morfologia e biologia de <i>Rhynchophorus palmarum</i>	2
Origem e distribuição	3
Danos e hospedeiros	4
Estudos moleculares	5
LITERATURA CITADA.....	7
2 ESTRUTURA GÉNÉTICA DE POPULAÇÕES NORDESTINAS DE <i>Rhynchophorus palmarum</i> (L.) (COLEOPTERA:CURCULIONIDAE)	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO	14
MATERIAL E MÉTODOS	15
RESULTADOS	19
DISCUSSÃO.....	20
AGRADECIMENTOS.....	22
LITERATURA CITADA.....	23

3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
---	----------------------------	----

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Broca-do-olho-do-coqueiro, *Rhynchophorus palmarum*

A ordem Coleoptera é composta por cerca de 360 mil espécies, representando cerca de 40% das espécies de insetos e de 30% de todas as espécies animais conhecidos (Lawrence & Britton 1991, Lawrence & Newton 1995). Na região Neotropical são conhecidas 127 famílias e 72.476 espécies (Costa 2000). A ordem Coleoptera tem ocupado a maior parte dos ambientes da Terra, apresentando os mais variados hábitos alimentares, exceto a hematofagia (Lawrence *et al.* 2000). O aspecto que permitiu a conquista dos mais variados ambientes durante a evolução desta ordem foi a presença de élitros e a capacidade de consumir diferentes tipos de alimento (Daly *et al.* 1998).

A família Curculionidae possui cerca de 60.000 espécies descritas. Os adultos são facilmente reconhecidos por apresentarem corpo cilíndrico e pela presença de uma cabeça prolongada em um rostro de comprimento muito variável, reto ou curvo, porém, geralmente cilíndrico e voltado para baixo. No meio do rostro, geralmente estão articuladas as antenas que, por via de regra, são genículo-clavadas, na maioria das espécies articulando-se no meio ou perto do meio do rostro e apresentam escapo mais ou menos alongado, que geralmente se encaixa num sulco longitudinal (escrobo) ou obliquamente dirigido para trás e para baixo, aos lados do rostro, atingindo ou não a margem anterior do olho. No final do rostro, estão inseridas as peças bucais mastigadoras. Adultos e larvas são geralmente fitófagos, podendo se alimentar praticamente de qualquer parte viva ou morta dos vegetais. As larvas são geralmente endofíticas, vivendo como coleobrocas (Ambrogi *et al.* 2009, Garcia *et al.* 2011, Rafael *et al.* 2012).

Entre as espécies descritas na família Curculionidae estão as classificadas como pertencentes ao gênero *Rhynchophorus*, que é constituído por dez espécies descritas, dentre as quais sete são consideradas pragas de coqueiro, *Cocos nucifera*. Entre estas espécies está inserida a broca-do-olho-do-coqueiro, *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus), sendo comum em florestas virgens neotropicais e em agroecossistemas florestais por se alimentar de palmeiras de óleo (Ambrogi *et al.* 2009).

Morfologia e Biologia de *Rhynchophorus palmarum*

Os ovos de *R. palmarum* apresentam coloração branco-creme, superfície lisa, são ovalados e medem aproximadamente 0,25 cm x 0,10 cm. São depositados em incisões na base das folhas das plantas hospedeiras, a uma profundidade de 0,1 cm a 0,2 cm, e são protegidos por uma substância gomosa de cor amarelo-creme (Sánchez *et al.* 1993).

A larva de *R. palmarum*, no ultimo instar mede 75 mm de comprimento por 25 mm de largura. Tem o corpo recurvado, de cor branco-creme, subdividido em 13 anéis enrugados. Os anéis medianos são muito maiores que os dianteiros e os traseiros, dando à larva um aspecto singular. No primeiro anel, observam-se duas malhas quitinosas transversais e oblíquas de coloração amarelado-escura. As malhas quitinosas ocorrem também na parte lateral dos três primeiros anéis. Em toda a superfície do corpo da larva, observam-se pequenas manchas irregulares, das quais saem pêlos rígidos e curvos. Ao atingir seu desenvolvimento completo, a larva cessa o crescimento e inicia a construção do casulo, com as fibras da palmeira, geralmente próximo à casca ou na base das folhas. Dentro do casulo, que mede 80 mm a 100 mm de comprimento por 30 mm a 40 mm de diâmetro (Ferreira *et al.* 2002).

O adulto deste inseto é de coloração preto-opaca e aveludada, com 45 mm a 60 mm de comprimento por 15 mm de largura, pesando de 1,6 a 2 g. Possui um bico recurvado (rosto) e

forte, que mede de 10 mm a 12 mm de comprimento de rostro desenvolvido (Bondar 1940). Os élitros são curtos, não cobrem a extremidade do abdome e têm nove sulcos longitudinais, dos quais cinco são superficiais e confusos. O dimorfismo sexual é percebido pela presença de pelos rígidos no lado dorsal do rostro do macho (Foto 1) (Gallo *et al.* 2002, Ferreira *et al.* 2002, OEPP 2005).

É um inseto de hábito diurno, principalmente nas horas com temperaturas mais amenas, sendo capaz de se deslocar 1,6 km por dia e a fêmea quando atraída para o hospedeiro penetra no meristema apical, onde coloca seus ovos (Hagley 1965, Takada *et al.* 2014). As fêmeas efetuam a postura de cinco a seis ovos por dia, perfazendo um total de até 250 ovos durante a vida. Após dois ou três dias, as larvas eclodem e começam a abrir galerias nos tecidos das plantas, principalmente na gema apical, no pecíolo das folhas novas e no estipe (Gallo *et al.* 2002).

Origem e distribuição

O gênero *Rhynchophorus* tem distribuição Pantropical, sendo representado na América do Sul pela espécie *R. palmarum* (Ferreira *et al.* 2002). Este inseto tem origem americana, ocorrendo desde a Argentina até a Califórnia, incluindo as Antilhas (Bondar 1940). Sua ocorrência tem sido relatada em estudos científicos nos estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul (Silva *et al.* 1968), Rio Grande do Norte, Sergipe, Alagoas (Ferreira *et al.* 1998) e Mato Grosso do Sul (Sánchez-Soto & Nakano 2002).

Além do Brasil, países como México, Caribe, Costa Rica, Cuba, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Panamá, Porto Rico, Trinidad e Tobago, Belize, Dominica, Guadalupe, Martinique, São Vicente, Argentina, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana,

Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai e Venezuela já relataram a presença da broca-do-olho-do-coqueiro (OEPP 2005).

Danos e Hospedeiros

Dentre os curculionídeos que atacam o coqueiro, *R. palmarum* é o mais severo, pois além da capacidade de localizar sua planta hospedeira a longas distâncias através do olfato, causa perdas na plantação pela sua alimentação, onde 30 larvas são suficientes para causar a morte de uma planta adulta (Griffith 1968, Ferreira *et al.* 2002). Em plantas jovens, é possível que um número menor de larvas provoque o mesmo efeito (Sánchez & Cerda 1993). Além disso, é o principal vetor do nematoide *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) Baujard, agente causal da doença letal conhecida como anel-vermelho do coqueiro (Ferreira *et al.* 2002).

Os odores da fermentação produzidos pelas plantas infestadas ou estressadas, devido aos ferimentos durante a colheita e os tratos culturais, atraem insetos adultos de *R. palmarum* que se alimentam, copulam e ovipositam nas cicatrizes recém-abertas (Duarte *et al.* 2003). Em Arecáceas, as larvas da broca-do-olho-do-coqueiro penetram pela gema apical das plantas e entre as folhas em formação, danificando-as e, conseqüentemente, destruindo-as (Gallo *et al.* 2002).

A presença de *R. palmarum* tem sido relatada em espécies como dendê americano (*Attalea cohune* Mart.), babaçu (*Orbignya speciosa* Mart.), bacabá (*Oenocarpus* sp. Mart.), cana-brava (*Gynerium saccharoides* (Aubl.) P. Beauv), carnaúba (*Copernicia cerifera* (Arruda) Mart.), coqueiro (*Cocos nucifera* Linnaeus), coqueiro-de-catarro (*Acrocomia sclerocarpa* (Jacq.) Mart.), dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.), jerivá (*Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman), aricuriroba (*Syagrus schizophylla* (Mart.) Glassman), licurizeiro (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc.), pupunha (*Guilielma* sp. Herrera), Jaracatiá (*Jacaratia spinosa* (Aubli) A. DC.), palmeira-das-canárias (*Phoenix canariensis* Chabaud.), palmeira imperial (*Roystonea oleracea* (Jacq.) O. F.

Cook), palmeira real (*Roystonea regia* (Kunth) O.F.Cook), palmito-juçara (*Euterpe edulis* Mart.), tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) e palmeira-cana (*Sabal umbraculifera* Mart.) (Silva *et al.* 1968). Observou-se que esta praga também pode ainda utilizar como planta hospedeira, ou fonte de alimento, a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* Linnaeus), o mamoeiro (*Carica papaya* Linnaeus), o abacaxizeiro (*Ananas comosus* Linnaeus), a bananeira (*Musa paradisiaca* Linnaeus), dentre outros, levando a perdas e danos consideráveis às respectivas plantações (Ferreira *et al.* 1998, Navarro *et al.* 2000).

Estudos moleculares

Toda a diversidade dos seres vivos baseia-se em polimorfismos contidos nas moléculas de DNA. A partir de estudos genéticos é possível investigar a diversidade biológica encontrada nas populações e nas espécies, assim como o seu destino ao longo do tempo (Klaczko & Vieira 2003). No final da década de 1960 o advento das técnicas moleculares possibilitou o desenvolvimento de hipóteses testadas experimentalmente a partir de dados empíricos sobre os fatores e padrões da variação genética, permitindo abordagens mais precisas e grandes progressos nos estudos populacionais e evolutivos em níveis inter- e intraespecíficos (Assis 2010).

Os estudos de polimorfismos nas populações eram realizados, até o ano de 1966, com base nos fenótipos dos organismos, o que não permitia uma boa detecção da variabilidade genética populacional, uma vez que tais caracteres apresentavam níveis reduzidos de polimorfismo e diferentes tipos de heranças, e por isso, foram substituídos pelas isoenzimas, que representam uma classe de marcadores moleculares desenvolvida por Harrys (1966) e Hubby & Lewontin (1966). No entanto, para alguns organismos e enfoques esta técnica não é a mais apropriada, pois detecta pouca variabilidade e por isso marcadores moleculares de DNA foram tomando espaço nos estudos sobre genética populacional, isto porque o DNA pode ser extraído de qualquer organismo

e como se analisa o genótipo (DNA) e não o fenótipo (proteína) o polimorfismo detectado é maior (Brito 2005). Atualmente, grande ênfase é colocada em estudos do mtDNA como marcador de diversidade genética, sendo este de extrema utilidade para investigações sobre relações filogenéticas entre diferentes taxóns e identificação de subdivisão geográfica entre unidades populacionais (Eizirik 1996).

Desde as décadas de 1970-1980 a molécula do DNA mitocondrial passou a fazer parte de muitos, senão da maioria dos estudos envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas e o entendimento de vários aspectos biológicos e evolutivos de uma grande variedade de organismos, por apresentar características genéticas e estruturais extremamente peculiares e únicas (Wilson *et al.* 1985, Avise *et al.* 1987, Moritz *et al.* 1987, Avise 1994). O DNA mitocondrial é uma molécula muito peculiar por apresentar: herança materna; ausência de recombinação; conteúdo gênico conservado; regiões intergênicas pequenas ou ausentes e alta taxa de evolução quando comparada ao DNA nuclear (Moritz *et al.* 1987). Sendo a herança do DNA mitocondrial materna, mutações acumuladas não são dispersas por meio de recombinação (Avise *et al.* 1987).

O DNA *barcode* (código de barras de DNA) tem sido proposto como uma ferramenta universal na identificação da diversidade biológica (Hebert *et al.* 2003). Este método de identificação foi baseado a partir de um conjunto de informações a partir de um fragmento de cerca de 690 pares de base de sequências de DNA do gene citocromo oxidase I de diferentes espécies animais. Dessa forma, novas espécies foram identificadas, indivíduos reclassificados em espécies pré-existentes, espécies crípticas separadas e agrupamentos de indivíduos dentro de espécie foram detectados, demonstrando a exequibilidade e aplicabilidade dessa abordagem na ampliação do conhecimento da biodiversidade e suas relações ecológicas (Rosa & Sonoda 2010).

O método DNA *barcoding* fornece soluções confiáveis, de baixo custo, resolvendo a

problemática de identificar corretamente as espécies, favorecendo o entendimento da evolução e diversificação da vida (Rosa & Sonoda 2010). Em estudos com populações do gênero *Rhynchophorus*, quando realizada a comparação de sequências de DNA mitocondrial de citocromo-oxidase subunidade I (COI) de populações nativas e introduzidas do gorgulho vermelho das palmeiras *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier), foi possível constatar que *R. ferrugineus* é nativo do norte e oeste do sudeste da Ásia continental, Sri Lanka e das Filipinas. Através destes estudos, foi possível concluir que todas as populações invasoras desta praga no mundo são originárias daquela região (Rugman-Jones *et al.* 2013).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo molecular através do marcador molecular COX I de sete populações, distribuídas em quatro estados do nordeste do Brasil e identificadas, primariamente, como *R. palmarum* e analisar a divergência genética existente entre estas populações.

Literatura Citada

- Takada, H.M., A. Batista Filho & H. Hojo. 2014.** Aspectos biológicos de *Rhynchophorus palmarum* Linnaeus, 1764 (Coleoptera: Curculionidae) em banana-prata (*Musa sapientum*). O Biológico 76: 35-39.
- Silva, A.G.A., C.R Gonçalves, D.M. Galvão, A.J.L. Gonçalves, J. Gomes, M.N. Silva & L. Simoni. 1968.** Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil, seus parasitos e predadores. Brasília, Ministério da Agricultura, 622p.
- Sánchez-Soto, S. & O. Nakano. 2002.** Registro de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) no Estado do Mato Grosso do Sul. Neotrop. Entomol., 31: 659-660.
- Sánchez, P.A. & H. Cerda. 1993.** El complejo *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) - *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) (Tylenchida: Aphelenchoididae), en palmeras. Bol. Entomol. Venez. 8:1-18.
- Rugman-Jones, P.F., C.D. Hoddle, M.S. Hoddle & R. Stouthamer. 2013.** The lesser of two weevils: molecular-genetics of pest palm weevil populations confirm *Rhynchophorus vulneratus* (Panzer 1798) as a valid species distinct from *R. ferrugineus* (Olivier 1790), and reveal the global extent of both. PLoS ONE 8: 10.

- Rosa, A.J.M. & K.C. Sonoda. 2010.** Aplicação de DNA Barcoding no levantamento de espécies de insetos. Planaltina, Embrapa Cerrados, 1p.
- Rafael, J.A., G.A.R. Melo, C.J.B. Carvalho, S.A. Casari & R. Constantino. 2012.** Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia. Ribeirão Preto. Holos Editora, 810 p.
- OEPP. 2005.** Organization Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes. *Rhynchophorus palmarum*. European and Mediterranean Plant Protection Organization. OEPP/EPPO, Bull. OEPP/EPPO. 35: 468-471.
- Navarro, D.M.A.F., M.M. Murta, A.G. Duarte, I.S. Lima, R.R. Nascimento & A.E.G. Sant'Ana. 2000.** Aspectos práticos relacionados ao uso do Rincoforol, o feromônio de agregação da Broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) no controle de pragas do coqueiro. Análise de sua eficiência em campo. Quim. Nova 25: 32-36.
- Moritz, C., T.E. Dowling & W.M. Brown. 1987.** Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. Annu Rev. Ecol. Syst. 18: 269-292.
- Lawrence, J.F., A.M. Hastings, M.J. Dallwitz, T.A. Paine & E.J. Zurcher. 2000.** Beetles of the World. A key and information system for families and subfamilies. Camberra, CISO Publishing, Versão 1.0 MS.
- Lawrence, J.F. & E.B. Newton. 1995.** Families and subfamilies of Coleoptera (with select genera, notes, references and data on family-group names), p. 779-1006. In J.F. Papaluk & S. A. Slipinski (eds.), Biology, Phylogeny and classification Coleoptera. Varsóvia, Museum I Institut Zoologii PAN, 1092p.
- Lawrence, J.F. & E.B. Britton. 1991.** Coleoptera. p. 543-683. In The Insects of Australia. 2. Melbourne University Press. Australia, 1137 p.
- Klaczko, L.B. & Vieira, R.D. 2003.** Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica do Brasil: Genética versão preliminar. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Diretoria de Conservação da Biodiversidade. Projeto Estratégia Nacional de Diversidade Biológica. Brasília, 7p.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball & J.R. Dewaard. 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 270: 313-321.
- Hagley, E.A.C. 1965.** On the life history and habitats of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* (L.). Ann. Entomol. Soc. Am. 58: 22-28.
- Griffith, R. 1968.** The relationship between the red ring nematode and the palm weevil. J. Agric. Soc. Trinidad and Tobago 68: 342-356.
- Garcia, F.R.M., J.A. Lutinski & C.J. Lutinski. 2011.** Biodiversidade da floresta de Chapecó: Baraúna, 543p.

- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, S., R. P. L. Carvalho, G.C. Batista, E. Berti Filho, J. R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramin, L.C. Marchini, J.R.S. Lopes & C. Omoto. 2002.** Entomologia agrícola. Piracicaba, FEALQ, 920 p.
- Ferreira, J.M.S., R.P.C. Araújo & F.B. Sarro. 2002.** Táticas de manejo das pragas, p. 83-106. In J.M.S. Ferreira (ed.), Coco, fitossanidade. Aracaju, Embrapa Tabuleiros Costeiros, 136 p.
- Ferreira, J.M.S, D.N.R. Warwick & L. A. Siqueira. 1998.** A Cultura do coqueiro no Brasil. Brasília, Embrapa Editora, 292p.
- Eizirik, E. 1996.** Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. Rev. Bras. Gen. 19: 23-29.
- Duarte, A.G., I.S. Lima, D.M.A.F. Navarro & A.E.G. Sant'Ana. 2003.** Captura de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) em armadilhas iscadas com o feromônio de agregação e compostos voláteis de frutos do abacaxi. Rev. Bras. Frut. 25: 81-84.
- Daly, H.V., J.T. Doyen & A.H. Purcell III. 1998.** Introduction to Insect Biology and Diversity. Oxford University Press, Oxford. 680p.
- Costa, C. 2000.** Estado de conocimiento de los Coleoptera Neotropicales p. 99-114. In: F. Martin Piera, J. J. Morrone & A. Melic (eds.). Hacia un Proyecto CYTED para el inventario y estimación de la diversidad Entomológica en Iberoamérica: PrIBES-2000. Zaragoza, Soc. Entomol. Aragonesa (SEA), 326 p.
- Brito, R.M. 2005.** Análise molecular e populacional de *Partamona mulata* (Moure in Camargo, 1980) e *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Tese de doutorado, Instituto de Biociências, USP, 72p.
- Bondar, G.A. 1940.** Insetos nocivos e moléstias do coqueiro (*Cocos nucifera*) no Brasil. Tipografia Naval, Bahia, 160p.
- Arias, M.C., F.O. Francisco & D. Silvestre. 2003.** O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos, 305-309. In: G. A. R. Melo & I. Alves-dos-Santos (eds.), Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure. Criciúma, Unesc Editora 320 p.
- Avise, J.C. 1994.** Molecular markers, natural history and evolution. New York. Chapman and Hall. 511p.
- Avise, J.C., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb & N.C. Saunders. 1987.** Intraespecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematics. Annu. Rev. Ecol. Syst. 18: 489-522.

Ambrogi, B.G., D.M. Vidal, P.H.G. Zarbin & G.H. Rosado-Neto. 2009. Feromônios de agregação em curculionidae (insecta: coleoptera) e sua implicação taxonômica. *Quím. Nova* 32: 2151-2158.

CAPÍTULO 2

ESTRUTURA GÉNÉTICA DE POPULAÇÕES NORDESTINAS DE *Rhynchophorus palmarum* (L.) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)¹

CLEANE S. SILVA², MOISES T.S. FREITAS³, MANOEL G.C.G. JUNIOR² E VALDIR Q. BALBINO³

²Departamento de Agronomia – Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil;

³Departamento de Genética – Universidade Federal de Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brasi.

¹Silva, C.S., M.T.S. Freitas, Gondim Junior, M.G.C & Balbino, V.Q. Estrutura génética de populações naturais de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae). A ser submetido.

RESUMO - Dentre os curculionídeos que atacam as arecáceas a Broca-do-olho-do-coqueiro, *Rhynchophorus palmarum*, é considerado o mais importante no Brasil, pois causa perdas consideráveis devido a sua alimentação, e pelo grande número de hospedeiros. Este inseto é conhecido por causar prejuízos ao coqueiro e ao dendezeiro no Brasil já no século XVI. E apesar de tanto tempo de existência, poucos estudos moleculares a respeito desta praga têm sido documentados. Deixando dúvidas sobre a homogeneidade genética das populações. Assim, este trabalho objetivou realizar um estudo da estrutura genética de sete populações de *R. palmarum* coletadas na região Nordeste do Brasil através do marcador molecular mitocondrial, COX I e analisar a divergência genética existente entre estas populações. Através de algoritmos de análise filogenética foi detectada a presença de dois clados separando a população de Fortaleza-CE das demais populações. Através da rede de haplótipos foi possível detectar a presença de apenas 12 haplótipos onde o haplótipo H1 foi o mais frequente devido a sua presença em 117 indivíduos distribuídos entre as populações analisadas, além disso também observamos que a população de Fortaleza não compartilha esses haplótipos, mostrando a existência de uma diferença genética. Foi possível observar também no índice de F_{ST} um alto valor de divergência genética, quando comparado a população de Fortaleza (CE) com as demais.

PALAVRAS-CHAVE: Inseto, DNA *barcode*, divergência molecular

POPULATION GENETICS STRUCTURE OF NORTHEASTERN *RHYNCHOPHORUS*

PALMARUM (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

ABSTRACT – Among the weevils that attack the Arecaceae Broca-the-eye-of-coconut tree, *Rhynchophorus Palmarum*, is considered the most important in Brazil, because it causes considerable losses due to its power, and the large number of hosts. This insect is known to cause damage to coconut and oil palm in Brazil since the sixteenth century. And although so long in existence, few molecular studies of this pest have been documented. Leaving doubts about the genetic homogeneity of the population. This work aimed to carry out a study of the genetic structure of seven populations of *R. Palmarum* collected in the Northeast of Brazil through mitochondrial molecular marker, COX I and analyze the genetic divergence between populations. Through phylogenetic analysis algorithms detected the presence of two clades separating the population of Fortaleza from other populations. By haplotype network was possible to detect the presence of only 12 haplotypes where the haplotype H1 was the most frequent due to its presence in 117 individuals distributed among the populations analyzed, in addition also noted that the population of Fortaleza does not share these haplotypes shown the existence of a genetic difference. It was also observed in the F_{ST} index high value of genetic diversity when compared to the population of Fortaleza (CE) with the other.

KEY WORDS: Insect, DNA barcode, molecular divergence

Introdução

O gênero *Rhynchophorus* contém dez espécies, das quais *Rhynchophorus bilineatus* (Montrouzier), *Rhynchophorus cruentatus* (Fabricius), *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier), *Rhynchophorus phoenicis* (Fabricius) e *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus) se destacam por causar danos em areáceas (Wattanapongsiri 1966). São vários os hospedeiros de *R. palmarum*, pertencentes a 12 diferentes famílias botânicas, sendo as Areáceas àquela com maior número de hospedeiros, totalizando 22 espécies (Cysne *et al.* 2013).

Dentre os curculionídeos que atacam o coqueiro, *R. palmarum* é considerado o mais importante, pois causa perdas consideráveis devido a alimentação e, principalmente, por ser o principal vetor do nematoide *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) Baujard, agente causal da doença letal conhecida como anel-vermelho-do-coqueiro (Ferreira 2002). Este inseto era conhecido por causar prejuízos ao coqueiro e ao dendezeiro no Brasil já no século XVI (Bondar 1940). Apesar do reconhecimento dessa espécie como praga, poucos estudos moleculares têm sido documentados, sendo todos os estudos desta praga e de suas populações totalmente baseados em características morfológicas.

A quantificação da variação genética e a consequente explicação da origem, manutenção e importância evolutiva desta variação compõem o campo de atuação da genética de populações. Uma população sofre os efeitos de vários fatores genético-evolutivos tais como seleção, fluxo gênico, mutação e deriva genética. As populações são frequentemente subdivididas em pequenas unidades por fatores geográficos, ecológicos ou comportamentais. Estas subdivisões da população podem exercer consideráveis influências sobre o fluxo gênico entre estas subpopulações ou agrupamentos. O alto fluxo gênico entre estas subpopulações deixam mais homogêneas as variações genéticas encontradas nestes grupos, enquanto o baixo fluxo gênico leva a um processo de diferenciação genética entre os grupos pelos efeitos da seleção, mutação e deriva genética

(Hartl 1981, Hartl & Clark 2007). Vários estudos com enfoque filogeográfico têm explicado princípios e processos determinantes da distribuição geográfica de linhagens geneticamente relacionadas, especialmente as relacionadas ao nível intraespecífico como dispersão e variância. Populações isoladas são grandes candidatas a adaptações genéticas diferentes, pois cada uma pode estar submetida a pressões de seleção divergentes sem a influência homogenizante do fluxo gênico (Avise *et al.* 1987, Avise 2000).

Assim, este trabalho objetivou realizar um estudo da estrutura genética de sete populações de *R. palmarum* distribuídas na região Nordeste do Brasil através do marcador molecular mitocondrial, COX I e analisar a divergência genética existente entre estas populações.

Material e Métodos

Coleta de *Rhynchophorus palmarum*. As coletas de *R. palmarum* foram realizadas em quatro estados do Nordeste brasileiro: Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Ceará. Nos três primeiros locais foram usados dois pontos, para o estado de Alagoas, Pernambuco e Paraíba e um único ponto no estado do Ceará (Tabela 01).

Essas coletas foram realizadas com auxílio de armadilhas artesanais (Ferreira *et al.* 2002), fabricadas a partir de recipientes de polietileno com capacidade para 60 litros com quatro orifícios na tampa para a entrada dos insetos, nestes recipientes foram depositados feromônio de agregação sintético e toletes de cana de açúcar semi-macerados e foram instalados em campo e inspecionados a cada quinze dias, coletando assim a maior quantidade de insetos possíveis (Foto 2). Os insetos foram coletados vivos foram armazenados individualmente em potes de polietileno com capacidade para 50 ml, identificados com etiqueta adesiva, transportados e mantidos em laboratório. Os insetos coletados foram armazenados a -30°C, para paralisação de suas funções e logo depois era feita a separação por sexo, identificação com etiqueta de papel manteiga e a

adição de uma alíquota de 25 ml de etanol a 100% para a conservação desses indivíduos até o processo de análise molecular destes.

Extração de DNA, PCR e Sequenciamento. O DNA foi extraído a partir de um pequeno pedaço (2,5 a 3 mm) do tecido muscular retirado do trocanter de indivíduos adultos. Foi utilizado no procedimento de extração a resina Chelex® 100 (BioRad, Berkeley, California, USA) segundo o método descrito por Wash *et al.* (1991), onde o tecido era transferido para um tubo esterilizado de eppendorf com capacidade para 1,5 ml, adicionado 10ul de proteinase-K (> 600mAU / mL; Qiagen, Valência, CA) e 100ul de resina Chelex® 100 (BioRad, Berkeley, California, USA), realizando posteriormente a maceração utilizando um pistilo. A reação foi incubada a 56°C durante 2h, transferida para um tubo esterilizado, levada à desnaturação (95°C por 30 min.) e centrifugadas por 6 min. a 13X1000 rpm. Após esses procedimentos as amostras foram purificadas com Acetato de Amônio (7,5M), onde foi adicionando ao DNA 30 ul da solução de acetato de amônio e 100 ul de álcool absoluto, agitado com auxílio de vortex e em seguida centrifugado por 20 minutos. Após isso, foi retirado o álcool e adicionado 150 ul de álcool a 70%, centrifugado por mais 20 minutos, retirado o álcool e deixado secar por completo, em seguida foi acrescentado ao pellet 30 ul de água Milli-q autoclavada para suspender o DNA. As soluções de DNA foram estocadas a -20°C até o momento da reação de PCR. O procedimento foi realizado separadamente para cada população.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para amplificar uma seção do gene mitocondrial Citocromo oxidase I (COX I), associada ao DNA *barcode*, a partir de cada espécime. As reações iniciais foram realizadas com os primers de Bron Simon (El-Mergawy *et al.* 2011), mas estes não apresentaram resultados satisfatórios nos induzindo ao desenho de um primer específico, que foram gerados a partir de um banco de dados primário compostos por

algumas das sequências obtidas inicialmente e adicionado alguns espécimes correlacionados com *R. palmarum* presentes no banco de dados molecular GenBank. Depois de selecionados todos estes indivíduos, as sequências foram alinhadas no Mega v. 5.0 (Tamura *et al.* 2011), através do Muscle, e então foi selecionada algumas regiões conservadas entre as espécies (*Rhynchophorus* sp.). Obtendo as seqüências (Foward 5'-GATGAAGAGAATAGAGAAGG-3' e Reverse 5'-CTCGACATTGTTATTGTAAT-3') que foram avaliados com relações a parâmetros de especificidade através do OligoAnalyzer V. 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

As reações de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) consistiram de 12,5 µL do Mix Go Taq Colorless (Promega® Fitchburg, Wisconsin, USA), 7,5 µL de água milli-q autoclavada, 1,5 µL de cada primer, e 2µL de DNA molde a uma concentração de 50ng/ul. O procedimento de amplificação foi realizado no termociclador Multigene OptiMax Thermal Cycler TC 9610 (LABNETTM, Edison, New Jersey, USA) com os seguintes parâmetros de ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 47°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 1 minuto; a extensão final foi a 72°C por 7 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% através da luz UV e purificados usando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega® Fitchburg, Wisconsin, USA).

O sequenciamento foi realizado através do sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems, Cleveland, Ohio, USA). As sequências foram avaliadas quanto ao grau de confiabilidade de cada um dos nucleotídeos utilizando valores de PHRED 30, seguido da montagem dos consensos através do Software CodonCode Align. Alinhamentos locais foram realizados utilizando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.* 1990) para confirmação da especificidade dos produtos sequenciados.

Análises Filogenéticas. As sequências nucleotídicas correspondentes ao gene Citocromo Oxidase I de *R. palmarum* foram alinhadas e editadas usando o MEGA 6 (Tamura *et al.* 2011). Um alinhamento múltiplo foi realizado utilizando o programa Muscle (Edgar 2004). As análises das relações filogenéticas entre os haplótipos foram feitas através do modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros foram utilizados para avaliar a distância genética entre os espécimes. A análise de Neighbour-joining realizada no MEGA 6, foi usada para examinar as relações entre os táxons.

Neste estudo a sequência já descrita de um isolado Brasileiro, publicada no banco de dados NCBI, de *R. palmarum* (GU581629.1) foi adicionada para compor o conjunto de dados a fim de auxiliar na taxonomia molecular dos espécimes estudados. Foram utilizadas também sequências das espécies *Rhynchophorus ferrugineus* (JX294413.1), *Dynamis borassi* (AY131105.1) *Hylobius abietis* (KM451046.1), além da espécie Curculionidae *sp.* (KP421111.1).

Diversidade Genética e Estruturação Populacional. A diversidade genética intra-populacional foi mensurada através da análise de diversidade haplotípica e nucleotídica, valor K (número de grupos genéticos), número de sítios polimórficos e número de transições e transversões, utilizando-se os softwares DnaSP 5.0 (Rozas & Librado 2009) e o Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). O teste de neutralidade D de Tajima's baseia-se na distribuição das frequências de mutação e na distribuição de haplótipos, distinguindo as diferenças entre as sequências de DNA evoluindo aleatoriamente ("neutra") e daquelas que evoluem no âmbito de um processo não aleatório. Foram feitas análises quanto ao nível de diferenciação genética com base no índice de fixação de polimorfismo F_{st} de forma pareada entre as populações usando o software Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). O número médio de substituições por sítios entre as populações (D_{xy}), o número total de substituições por sítios entre as populações (D_a), número de polimorfismos compartilhados entre as populações pareadas (S_s) e o número de diferenças fixadas

entre as populações pareadas (S_f) foram calculados no software DnaSP 5.0 (Rozas & Librado 2009). A rede de haplótipos foi gerada através do software NETWORK 4.6 (www.fluxus-engineering.com) utilizando o método Median-joining (Bandelt & Rohl 1999) para verificar o nível de compartilhamento e a frequência de distribuição dos haplótipos entre as populações.

Resultados

A partir das 185 amostras amplificadas e sequenciadas foram obtidas 137 sequências com resultado satisfatório, sendo 48 sequências descartadas por erros de sequenciamento. Os fragmentos das 137 sequências utilizadas contiveram em média 490 pares de base referentes ao DNA *barcode* que foram reduzidos a 336 pares de bases após o alinhamento. Cada uma das sequências geradas foi submetida às análises comparativas utilizando o banco de dados moleculares encontrado no NCBI e depositadas no mesmo banco de dados com os números de acesso KU647489 - KU647625. Nas avaliações intrapopulacionais foram observados 14 sítios polimórficos e 322 sítios conservados distribuídos entre 12 sítios informativos de parcimônia e 2 *singletons*, representando respectivamente 4,17% e 0,6% do total de sítios observados. A composição de nucleotídeos o conteúdo GC foi de 36,8%.

Foram também realizadas análises de diversidade intrapopulacional, que evidenciaram baixos níveis de diversidades nucleotídica e haplotípica. Para o teste D Tajima de neutralidade as populações não apresentaram valores significativos, evidenciando que as populações aparentemente não estão sofrendo pressão seletiva (Tabela 02).

Os resultados obtidos através da análise de Neighbour-joining (Fig. 3) para as amostras de *R. palmarum* avaliadas neste trabalho apontaram para a existência de dois clados distintos. Um dos clados foi composto unicamente por amostras pertencentes à população de Fortaleza (CE),

por cinco indivíduos da população de Petrolina (PE) e um único indivíduo da população de Pitimbu. Além da espécie brasileira de *R. palmarum*, na qual a sequência foi retirada do banco de dados para uso de referência, confirmando assim que as populações avaliadas neste estudo pertencem apenas a espécie *R. palmarum*, já que também foram usadas, para fins de comparação, sequências de outras quatro espécies, as quais mostraram apenas mesmo ancestral comum. O segundo clado foi composto pelas demais populações estudadas, salientando o alto grau de similaridade genética entre elas.

Através da rede de haplótipos foi possível detectar a presença de 12 haplótipos diferentes designados como H1 a H12 (Fig. 4), onde o haplótipo H1 foi o mais frequente devido a sua presença em 117 indivíduos distribuídos entre os 137 espécimes em seis das sete populações investigadas. Além disso, foi possível observar o compartilhamento dos haplótipos (H7 e H8) entre as populações de Petrolina (PE) e Fortaleza (CE) e a presença dos haplótipos H1 e H2 na população de Petrolina (PE).

Através das análises interpopulacionais foi possível observar um alto valor de divergência genética, estimado a partir do parâmetro F_{ST} variando entre 0,00 e 0,848, quando comparado a população de Fortaleza (CE) com Santa Luzia do Norte (AL) (0.83540), de Fortaleza (CE) com Pitimbu (PB) (0.80421), de Fortaleza (CE) com Recife (PE) (0.82530), de Fortaleza (CE) com São Sebastião-AL (0.82149), e de Fortaleza (CE) com Rio Tinto (PB) (0.84872). E quando comparadas as populações de Fortaleza (CE) com Petrolina (PE), ainda foi observado um alto valor de divergência genética (0.66811) (Tabela 03 e 04).

Discussão

Baseado nos resultados obtidos através da análise de Neighbour-joining, foi possível constatar a presença de dois clados monofiléticos com valores de suporte de 65% e 80%,

separando a população de Fortaleza (FOR) em um grupo distinto, ao ser utilizado o marcador molecular DNA *barcode* nas populações estudadas. Resultados similares foram obtidos por El-Mergawy *et al.* 2011, ao analisarem populações de *R. ferrugineus* distribuídas em alguns países através do DNA *barcode*, obtendo-se dois grupos distintos de acordo com suas posições geográficas, demonstrando assim a eficiência deste marcador molecular na caracterização das espécies que compõem o gênero deste inseto de importância econômica.

A separação em dois clados indica que a população de *R. palmarum* existente em Fortaleza (CE), é constituída por indivíduos que não compartilham haplótipos com as demais populações, possivelmente, pelo estado do Ceará apresentar ao sul a Chapada do Araripe e ao leste a Chapada do Apodi, formando uma barreira geográfica. Porém nesse mesmo clado, foi possível perceber a presença das sequências de quatro indivíduos da população de Petrolina (PET) com a mesma estruturação genética da população de Fortaleza (CE). Possivelmente a ocorrência disto estar ligada a possibilidade de ocorrência de exportação de material vegetal para Petrolina-PE, já que este inseto possui uma grande variedade de hospedeiros. O possível transporte de *R. palmarum* por exportação de material vegetal também explica o fato de um único indivíduo da população de Pitimbu- PB, também apresentar agrupamento neste mesmo clado. Outra análise que nos leva a mesma hipótese de transporte dessa espécie em material vegetal é a rede de haplótipos. Que mostra a heterogeneidade da população de Petrolina (PE).

Ao analisar populações de *R. ferrugineus* coletadas em diversos países, Rugman-Jones *et al.* (2013), encontrou resultados similares. Em seu estudo foi observado a existência de duas populações diferentes e que exibida estrutura geográfica forte, onde uma possuía 43 haplótipos e características composta por os espécimes de populações nativas na Índia, Sri Lanka, Paquistão, Camboja, Vietnã e Filipinas, juntamente com populações invasoras no Mediterrâneo, Oriente Médio, Japão e Índias Ocidentais. Enquanto a outra apresentava 62 haplótipos e continha

características das populações nativas em Cingapura, as ilhas indonésias de Sumatra, Java e Bali, e a população invasiva na Califórnia. E ocorreu uma única sobreposição geográfica entre as duas linhagens no sul da Tailândia e do norte da Malásia na Península de Thai-Malay.

A análise de divergência genética estimada pelo índice F_{ST} não revelou valores significativos entre a maioria das populações de *R. palmarum*. Entretanto o alto valor apresentado pelo F_{ST} quando comparado a população de Fortaleza (CE) com a de Santa Luzia do Norte (AL) (0.83540), de Fortaleza (CE) com Pitimbu (PB) (0.80421), de Fortaleza (CE) com Recife (PE) (0.82530), de Fortaleza (CE) com São Sebastião (AL) (0.82149), e de Fortaleza (CE) com Rio Tinto (PB) (0.84872), nos mostra uma divergência genética considerável entre estas populações. Assim como o moderado valor de divergência genética quando comparadas as populações de Fortaleza (CE) com Petrolina (PE) (0.66811) nos mostra a similaridade de alguns indivíduos, corroborando com os resultados obtidos através da análise de Neighbour-joining.

O teste proposto por Tajima compara o número de sítios segregantes com o número médio de diferenças de nucleotídeos os quais são estimados a partir de comparações par a par das sequências de DNA dentro de uma população. É usado para testar a hipótese de que todas as mutações são seletivamente neutras. Neste estudo o teste de Tajima apresentou valores não significativos. Estes resultados indicam que a população, possivelmente, não passa por uma expansão recente. O que necessita de um estudo mais aprofundado, já que o marcador não permite identificar processos de evolução.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

Literatura Citada

- Wattanapongsiri A. 1966.** A revision of the genera *Rhynchophorus* and *Dynamis* (Coleoptera: Curculionidae). Bangkok, Department of Agriculture Science Bulletin, 1
- Walsh, P.S., D.A. Metzger & R. Higuchi. 1991.** Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR- based typing from forensic material. *BioTechniques* 10:506-513.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar. 2011.** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- Rugman-Jones, P.F., C.D. Hoddle, M.S. Hoddle & R. Stouthamer. 2013.** The lesser of two weevils: molecular-genetics of pest palm weevil populations confirm *Rhynchophorus vulneratus* (Panzer 1798) as a valid species distinct from *R. ferrugineus* (Olivier 1790), and reveal the global extent of both. *PlosOne* 8: 510-520.
- Rozas, J. & Librado, P. 2009.** DnaSP v5. A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *BioInformatics* 25: 1451-1452.
- Hartl, D.L. 1981.** A Primers of Population Genetics. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. 58p.
- Hartl, D.L. & Clark, A.G. 2007.** Principles of Population Genetics. Sunderland, Fourth Edition. 652p.
- Ferreira, J.M.S., R.P.C. Araújo & F.B. Sarro. 2002.** Táticas de manejo das pragas, p. 83-106. In J.M.S. Ferreira (ed.), *Coco, fitossanidade*. Aracaju, Embrapa Tabuleiros Costeiros, 136 p.
- Ferreira, J.M.S. 2002.** Controle biológico do agente transmissor do nematoide causador do anel-vermelho-do-coqueiro. Aracaju, Embrapa tabuleiros costeiros, 4p. (Circular Técnica 31).
- Excoffier, L. & H.E.L. Lischer 2010.** Arlequin suite version 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10: 564-567.
- El-mergawy, R.A.A.M., M.I. Nasr, N. Abdallah & J.F. Silvain. 2011.** Mitochondrial Genetic Variation and Invasion History of Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae), in Middle-East and Mediterranean Basin. *Int. J. Agric. Biol.* 13: 631-637.
- Edgar R.C. 2004.** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 19: 32.
- Cysne, A.Q., S.A. Rios, C. Krug & W.A.A. Lima. 2013.** Manejo de *Rhynchophorus palmarum* em campo de produção de sementes de palma de óleo. Manaus, Embrapa Amazônia Ocidental. 28 p. (Documentos / Embrapa Amazônia Ocidental 107).

- Bondar, G.A. 1940.** Insetos nocivos e moléstias do coqueiro (*Cocos nucifera*) no Brasil. Salvador, Tipografia Naval, 160p.
- Bandelt, H.J & F.P. Rohl. 1999.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* 16:37-48.
- Avise J.C. 2000.** Phylogeography: the history and formation of species. Massachusetts, Harvard University press, 578p.
- Avise J., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb & N.C. Saunders. 1987.** Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- Assis, A. F. 2010.** Estudo populacional e molecular de *Nannotrigona testaceicornis* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) através do DNA mitocondrial. Dissertação de Mestrado, USP, Ribeirão Preto, 66p.
- Altschul, S. F; W.Gish, W. Miller, E.W. Myers & D.J. Lipman. 1990.** "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

Tabela 1. Detalhamento das populações de *Rhynchophorus palmarum* usadas no estudo.

Local	Estado	Sigla	Número de indivíduos	Região	Localização
Santa Luzia do Norte	Alagoas	AL	18	Nordeste	9° 36' 20,15'' S 35° 49' 13,32'' O
São Sebastião	Alagoas	AL	13	Nordeste	9° 52' 38,60'' S 36° 30' 27,00'' O
Recife	Pernambuco	PE	13	Nordeste	8° 00' 53,07'' S 34° 56' 51,82'' O
Petrolina	Pernambuco	PE	27	Nordeste	9° 04' 13,07'' S 40° 19' 19,41'' O
Pitimbu	Paraíba	PB	20	Nordeste	7° 30' 11,31'' S 34° 48' 49,48'' O
Rio Tinto	Paraíba	PB	26	Nordeste	6° 48' 18,79'' S 35° 04' 32,06'' O
Fortaleza	Ceará	CE	20	Nordeste	3° 44' 46,20'' S 38° 34' 30,11'' O

Tabela 2. Medidas de diversidade genética para cada população de *Rhynchophorus*

palmarum.

Populações	Tajima's	N	Hd ¹	$\pi \pm SE^2$	NS ³	H ⁴	K ⁵
Santa Luzia	-1,40138	18	0,39869	0,001620 \pm 0,001355	3	4	0,43137
Pitimbu	-1,97235	20	0,19474	0,00237 \pm 0,001985	7	3	0,78947
Recife	-0,46216	13	0,50000	0,00162 \pm 0,001591	2	3	0,53846
São Sebastião	1,30045	13	0,51282	0,00154 \pm 0,001543	1	2	0,51282
Rio tinto	-1,22394	26	0,21846	0,00067 \pm 0,000908	2	3	0,22462
Fortaleza	0,9482	20	0,55263	0,00620 \pm 0,004739	6	4	2,06316
Petrolina	-0,30862	27	0,59259	0,00691 \pm 0,004381	9	6	2,27350
Total		137	0,55668	0,00766	13	12	2,55109

¹ Diversidade haplotípica;

² Diversidade nucleotídica.

³ Número de sítios segregantes;

⁴ Haplótipos;

⁵ Número médio das diferenças;

Tabela 3. Valor do Fst entre as sete populações de *Rhynchophorus palmarum* estudadas.

	LUZ ¹	SAO ²	REC ³	PET ⁴	PIT ⁵	RIO ⁶	FOR ⁷
LUZ ¹	0,00000						
SAO ²	0,09450	0,00000					
REC ³	0,00000	0,00000	0,00000				
PET ⁴	0,10937	0,10440	0,09781	0,00000			
PIT ⁵	0,00000	0,07990	0,00000	0,05160	0,00000		
RIO ⁶	0,00000	0,16358	0,01557	0,13612	0,00000	0,00000	
FOR ⁷	0,83540	0,82149	0,82530	0,66811	0,80421	0,84872	0,00000

¹Santa Luzia do Norte- AL;

²São Sebastião- AL;

³Recife- PE;

⁴Petrolina- PE;

⁵Pitimbu- PB;

⁶Rio Tinto- PB;

⁷Fortaleza- CE.

Tabela 4. Diferenciação genética entre populações de *Rhynchophorus palmarum*.

Populações		Fst ¹	Dxy ²	Da ³	Ss ⁴	Sf ⁵
Santa Luzia	Pitimbu	0,00000	0,00179	-0,00005	2	0
Santa Luzia	Recife	0,00000	0,00141	-0,00004	2	0
Santa Luzia	São Sebastião	0,09450	0,00157	0,00015	1	0
Santa Luzia	Rio tinto	0,00000	0,00096	-0,00002	1	0
Santa Luzia	Fortaleza	0,83540	0,02271	0,01896	1	4
Santa Luzia	Petrolina	0,10937	0,00456	0,00050	2	0
Pitimbu	Recife	0,00000	0,00199	-0,00001	1	0
Pitimbu	São Sebastião	0,07990	0,00213	0,00017	1	0
Pitimbu	Rio tinto	0,00000	0,00150	-0,00002	1	0
Pitimbu	Fortaleza	0,80421	0,02188	0,01759	2	0
Pitimbu	Petrolina	0,05160	0,00485	0,00025	7	0
Recife	São Sebastião	0,00000	0,00155	-0,00003	1	0
Recife	Rio tinto	0,01557	0,00116	0,00002	1	0
Recife	Fortaleza	0,82530	0,02236	0,01845	0	4
Recife	Petrolina	0,09781	0,00468	0,00046	1	0
São Sebastião	Rio tinto	0,16358	0,00132	0,00022	1	0
São Sebastião	Fortaleza	0,82149	0,02167	0,01720	1	0
São Sebastião	Petrolina	0,10440	0,00467	0,00049	1	0
Rio tinto	Fortaleza	0,84872	0,02271	0,01927	0	4
Rio tinto	Petrolina	0,13612	0,00434	0,00059	1	0
Fortaleza	Petrolina	0,66811	0,01962	0,01311	4	0

¹ Índice de fixação que ocorreu dentro das populações;

² Número médios de substituições nucleotídicas por sítios entre os dois grupos;

³ Número líquido de substituições por sítios entre as populações;

⁴ Sítios compartilhados;

⁵ Sítios fixados.

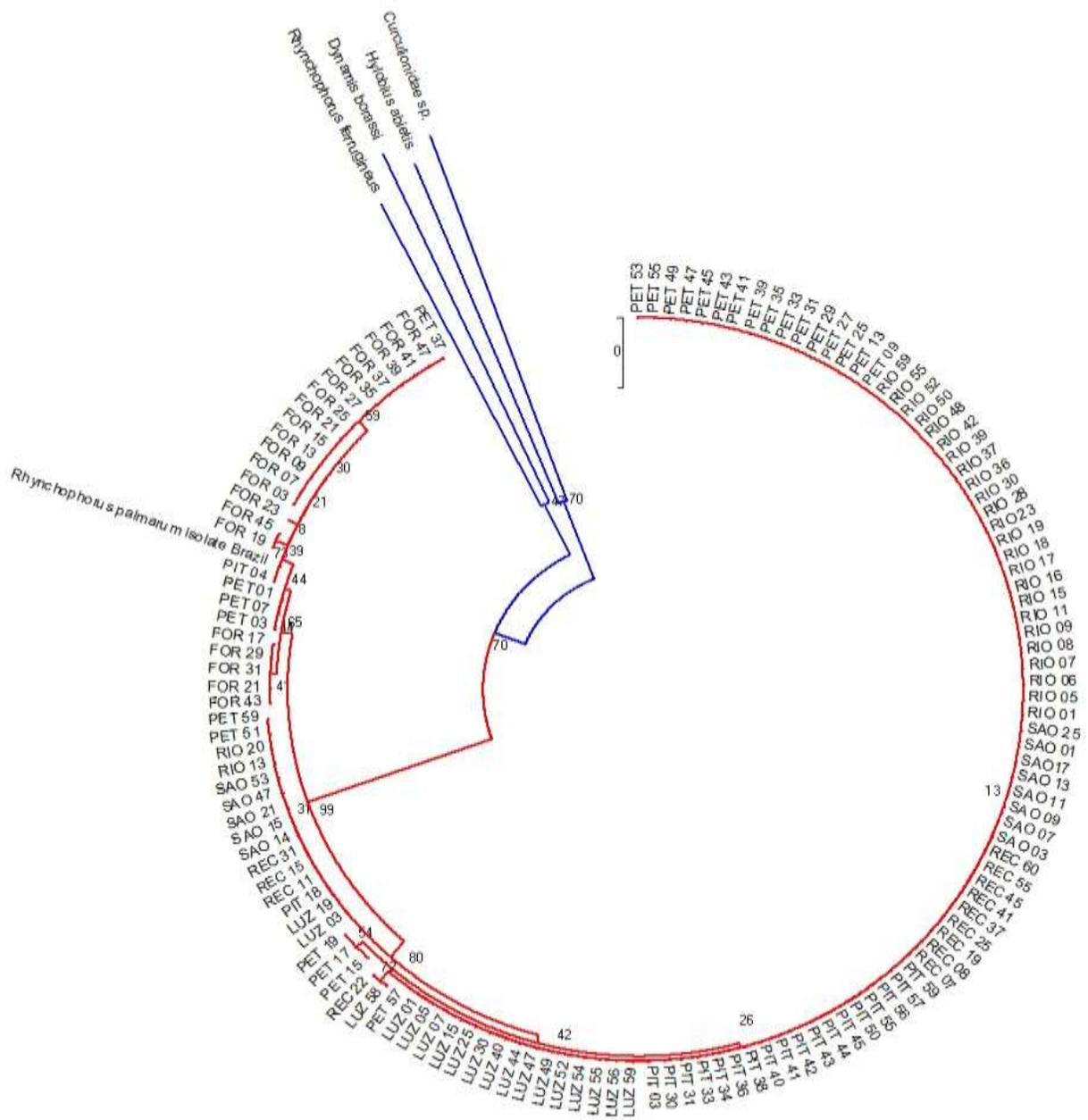


Figura 1. Árvore filogenética obtida através da análise de Neighbour-joining mostrando a presença de dois clado para *Rhynchophorus palmarum*.

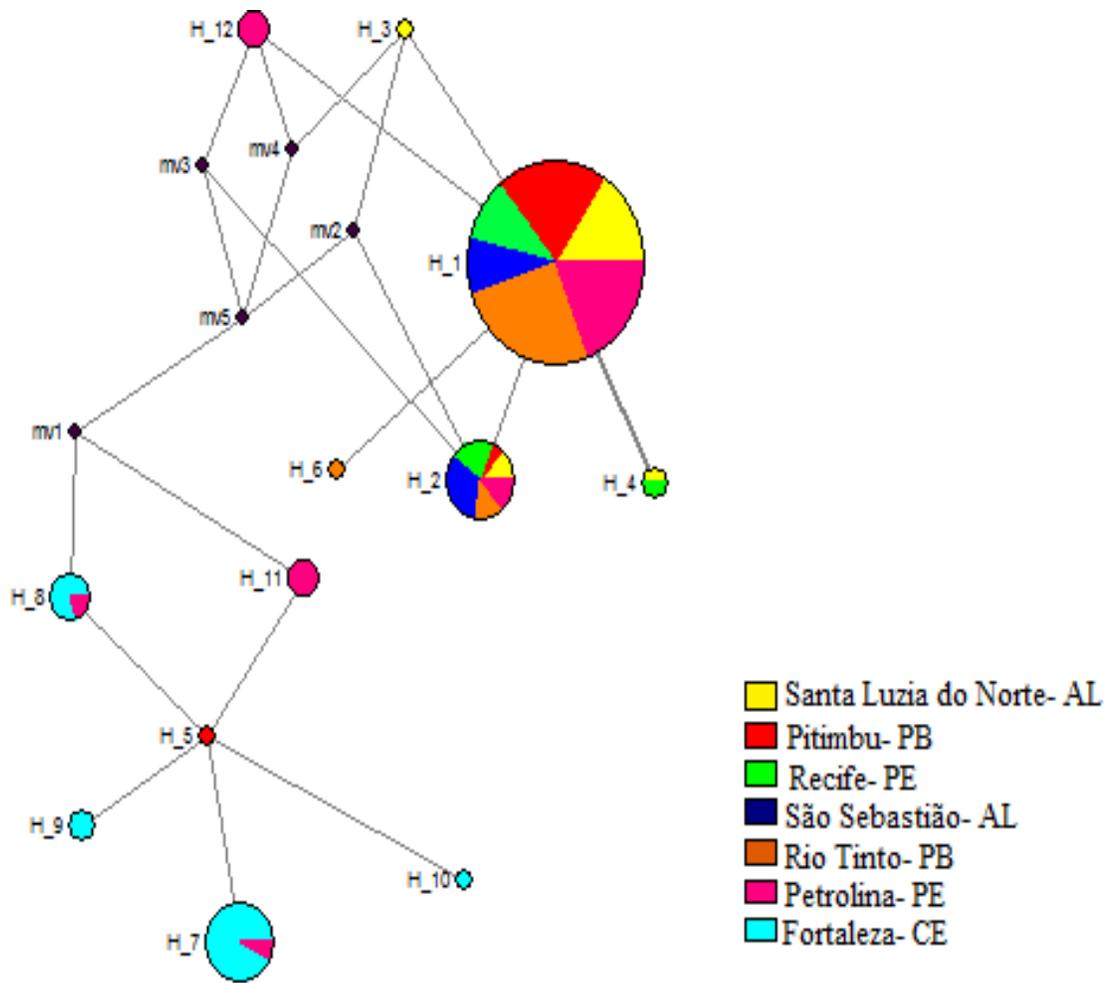


Figura 2. Frequência de Haplótipos encontrados nas sete populações de *Rhynchophorus palmarum*, mostrando o compartilhamento dessas seqüências de DNA herdadas e o não compartilhamento da população de Petrolina.



Foto 1. Dimorfismo sexual de *Rhynchophorus palmarum*, realizado pela presença de cerdas no rosto dos machos: fêmea (A) e macho (B) (Foto: Correia, R. G. 2011).



Foto 2. Armadilha artesanal para a captura de *R. palmarum* utilizada no estudo. Armadilha em campo (A), Armadilha aberta com sachê de feromônio sintético (B) e interior da armadilha com inseto capturado (C).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises moleculares mostraram a existência de dois clados monofiléticos distintos através das análises filogeográficas e de estruturação genética, sendo observado também que a população coletada em Fortaleza (FOR) apresenta uma estrutura genética diferenciada das demais populações estudadas nesse trabalho. Além disso, foi possível constatar a presença de alguns indivíduos da população de Petrolina (PET) com a mesma estruturação genética da população de Fortaleza (FOR), onde a ocorrência disto pode estar ligada a possibilidade de ocorrência de exportação de material vegetal para Petrolina-PE, já que este inseto possui uma grande variedade de hospedeiros. Os resultados aqui obtidos são um breve ensaio sobre os dados genéticos de *R. palmarum*, onde se fornece uma grande contribuição no conhecimento desses indivíduos que são importantes na agricultura. Porém, pesquisas futuras se faz necessária para um maior conhecimento desses organismos a nível genético.