

Diversidade Genética de *Diabrotica speciosa* e fungos entomopatogênicos

Daniel R. Sosa-Gomez

Richard A. Humber

Eliseu Binneck

Karina L. Silva-Brandão

Adriana Micheli

Diabrotica speciosa é uma das espécies desse gênero mais conhecidas na América do Sul e com ocorrência em todos os estados brasileiros. Porém, não existem estudos sobre a variabilidade genética dessas espécies no Brasil. O objetivo deste estudo foi gerar informações sobre a variabilidade genética de *D. speciosa* por meio de marcadores RAPD. O DNA genômico de indivíduos de *D. speciosa* foi amplificado por meio da técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA - Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), a fim de avaliar a diversidade genética de populações de diferentes locais. As populações foram coletadas em Primavera do Leste (MT), Paulínia (SP), Florestópolis, Ponta Grossa e Londrina (distrito de Warta) (PR). O DNA dos indivíduos foi amplificado por meio de 11 iniciadores. Todos os iniciadores selecionados possibilitaram a amplificação do DNA de *D. speciosa*, gerando bandas que variaram de 493 a 2409 pares de bases. Pode ser observado que a maioria dos indivíduos agrupa-se de acordo com a região geográfica onde foram coletados (Fig. 7). As populações que apresentaram agrupamentos com maior homogeneidade foram as de Ponta Grossa e Paulínia, sendo a população de Londrina a que apresentou maior heterogeneidade de genótipos, com indivíduos apresentando índice de similaridade de 8 %. Os indivíduos que apresentaram maior semelhança genotípica foram os de Ponta Grossa (PG25 e PG27) e de Paulínia (Pau155 e Pau161). Os indivíduos das populações de Florestópolis (PR), Primavera do Leste (MT), Paulínia (SP) e Ponta Grossa (PR) formaram agrupamentos com índices de similaridade próximos a 37 %. Nos agrupamentos pôde ser observada a ocorrência de indivíduos de outras regiões, indicando migração desses insetos mesmo entre locais

distantes, como Primavera do Leste (MT) e Paulínia (SP), distantes entre si 1.099 km. Essa migração ocorre porque *Diabrotica speciosa* possui elevada capacidade de voo. Os indivíduos de *D. speciosa* formam grupos diferentes dentro de cada população geográfica, embora a presença de indivíduos de outras regiões nos agrupamentos indique a frequência elevada de migração entre locais distantes; as populações que apresentaram agrupamentos com maior homogeneidade foram as de Ponta Grossa e Paulínia, sendo a população de Londrina que apresentou maior heterogeneidade de genótipos.

Por meio dos estudos de diversidade de fungos entomopatogênicos foram obtidas as sequências parciais do gene da SSU rDNA de dez espécies de fungos entomopatogênicos: *Tolyposcladium cylindrosporium* (isolado ARSEF 963), *Nomuraea rileyi* (isolados CNPSo 188, CNPSo 220, CNPSo 238, CNPSo 250, CNPSo 286, CNPSo 289, CNPSo 359, CNPSo 370, CNPSo 374, CNPSo 381, CNPSo 393, CNPSo 416, ARSEF 558, ARSEF 1760, ARSEF 1761, ARSEF 2202, ARSEF 2395, ARSEF 3940, ARSEF 6877, ARSEF 6879, ARSEF 6880, ARSEF 6881, ARSEF 6882), *Nomuraea anemonoides* (ARSEF 2467), *Metarhizium flavoviridae* (ARSEF 1184), *Metarhizium viridulus* (ARSEF 6927), *Metarhizium cylindrosporae* (ARSEF 6926), *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (ARSEF 5161), *Beauveria brongniartii* (ARSEF 1830), *Isaria amoenorozea* (ARSEF 744) e *I. javanica* (ARSEF 322). O tamanho dos produtos amplificados foi de aproximadamente 500 pb e 550 bp, respectivamente. Após a sobreposição, edição e alinhamento, a sequência inteira apresentou 854 bp para *I. javanica* até 918 bp para *M. cylindrosporae* e *M. viridulus*. Não foi observada variação entre as sequências de nucleotídeos (907 bp) dos 24 isolados de *N. rileyi*. Dos 1047 caracteres analisados, 291 (27,8 %) foram variáveis, 421 (40,2 %) foram constantes e 335 (31,9 %) foram informativos parcimoniosamente. A árvore de consenso estrito das duas árvores mais parcimoniosas com 1344 passos (CI = 68.5; RI = 74.1) está representada na Figura 8. O taxon *N. rileyi* está relacionado com uma clade composta de todos os representantes do gênero *Metarhizium*, com um elevado valor de *bootstrap*. A clade *Metarhizium* está formada por *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. cylindrosporae*, *M. viridulus*, *M.*

flavoviride e *N. rileyi*, com um suporte de *bootstrap* de 100 % na filogenia mitocondrial. Divergências evidentes entre *N. rileyi* e *N. anemonoides* ARSEF 2467 têm sido observadas após análise de RAPD, AFLP, ISSR e análise das sequências ITS1-5.8-ITS2 e nos resultados obtidos neste trabalho. O que leva a assumir que esse isolado não deve ser considerado do gênero *Nomuraea* a menos que seja possível estabelecer que as informações das sequências derivadas de *N. anemonoides* são de um fungo contaminante diferente do espécime holótipo. Não existem isolados de *N. anemonoides* disponíveis nas coleções mundiais de culturas diferentes do isolado estudado neste trabalho.

Não foi detectada variação intraespecífica nas sequências do rDNA mitocondrial dos isolados de *N. rileyi* representando regiões distantes ao redor do globo (Los Banos, Philippines, Celebes, Quincy, FL, Estados Unidos, Buenos Aires, Argentina, e Londrina, Brasil) ou entre aqueles isolados de hospedeiros diferentes. A maior parte dos quais pertence aos lepidópteros: lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*), falsas-medideiras (*Pseudoplusia includens* e *Rachiplusia nu*), curuquerê-do-algodoeiro (*Alabama argillacea*), lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda*, lagarta-do-arroz (*Rivula atimeta*), lagarta-enroladeira-do-arroz (*Cnaphalocrocis medinalis*), e o Plusiinae (*Plathypena scabra*), assim como a cigarrinha, *Sogatella fucifera* (Hemiptera: Delphacidae). Da mesma maneira, estudos do fragmento do gene da β -tubulina de vários isolados de *N. rileyi* revelaram falta de variabilidade intraespecífica nesse gene nuclear. Comparações das sequências do mt rDNA permitem inferir que *M. cylindrospora* está mais relacionado a *M. anisopliae* do que a *M. viridulus*, validando o posicionamento correto de *M. cylindrospora* e *M. viridulus* no gênero *Metarhizium*. As sequências de 885 bp de *M. anisopliae* (ARSEF 5161) compartilharam 99 % de identidade com a raça AB027361 e AY884128.1.

A SSU mt rDNA demonstrou ser útil na ajuda para diferenciar espécies dentro de diversos gêneros. As informações genômicas nucleares e mitocondriais parecem indicar o mesmo padrão de relações gerais.

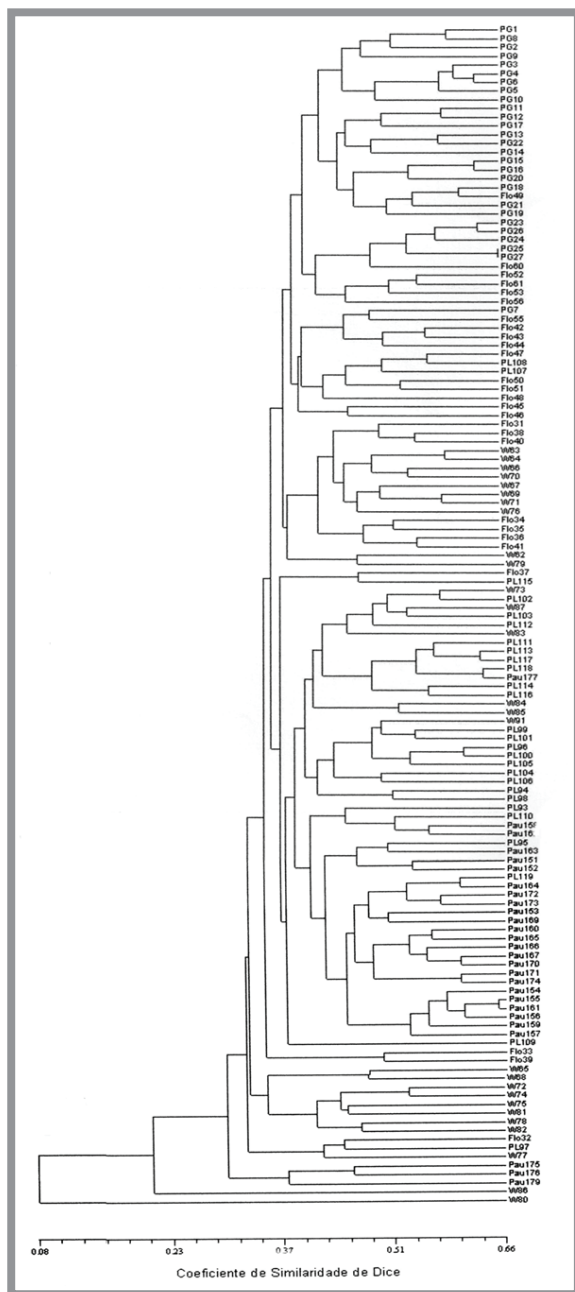


Fig.7. Dendrograma obtido mediante análise de RAPD de populações de *Diabrotica speciosa*, provenientes de Ponta Grossa (PG), PR; Florestópolis (Flo), PR; Londrina (Warta-W), PR; Paulínia (Pau), SP e Primavera do Leste (PL), MT.

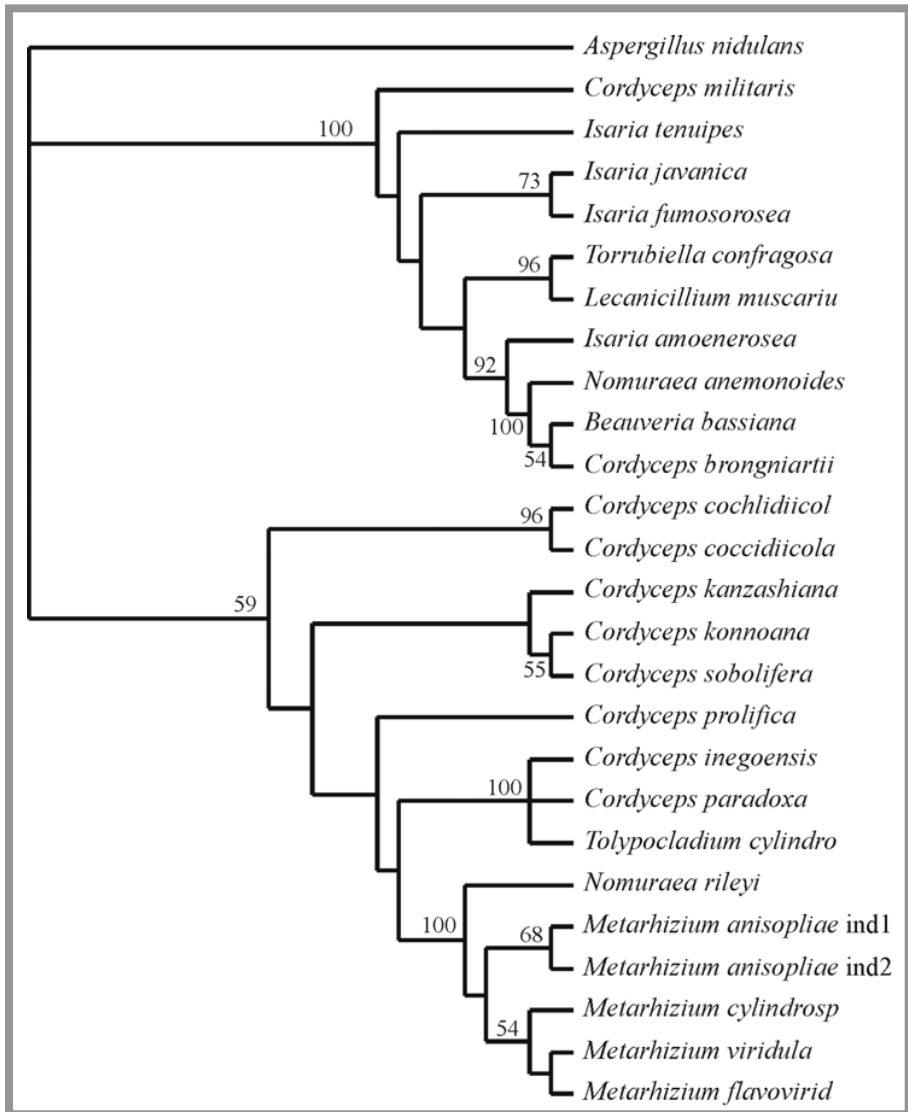


Fig. 8. Árvore de consenso estrito das duas árvores mais parcimoniosas com base na análise da sequências parciais de SSU rDNA mitocondrial de fungos entomopatogênicos. O alinhamento consistiu de 1025 posições de nucleotídeos. Os números sobre os ramos indicam valores de *bootstrap* (> 50 %). Valores obtidos com 1.000 réplicas.