



43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia
24 a 27 de Julho de 2006
João Pessoa - PB

VARIABILIDADE GENÉTICA MOLECULAR E MORFOLÓGICA DE “MAHANARVA SPECTABILIS” (DISTANT, 1909) EM DUAS PASTAGENS NO CERRADO.

SILVANA VIEIRA DE PAULA-MORAES¹, FÁBIO GELAPE FALEIRO², GRACIELE BELLON³,
KEIZE PEREIRA JUNQUEIRA⁴, GERVÁSIO SILVA CARVALHO⁵, ALLAN KARDEC BRAGA
RAMOS⁶, ALEXANDER MACHADO AUAD⁷, CHARLES MARTINS OLIVEIRA⁸

1 Pesquisadora – Entomologia - Embrapa Cerrados, BR 020, Km18, Caixa Postal 08223, Planaltina, DF, CEP 73301-970. e-mail: silvana@cpac.embrapa.br

2 Pesquisador – Genética Molecular – Embrapa Cerrados

3, 4 Estagiárias da Embrapa Cerrados

5 Professor – Taxonomia e Sistemática - PUCRS-FaBio-PPGZoologia, Av. Ipiranga,6681 - P.12D - S.44, C.P.1429 - CEP 90619-900, Porto Alegre-RS

6 Pesquisador – Forragicultura – Embrapa Cerrados

7 Pesquisador – Entomologia - Embrapa Gado de Leite, Laboratório de Entomologia, Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento 610, Bairro Dom Bosco, CEP 76038-330, Juiz de Fora – MG

8 Pesquisador – Entomologia – Embrapa Cerrados

RESUMO

Levantamentos recentes sobre ocorrência, mapeamento e estudos taxonômicos de “Mahanarva” no Cerrado e Amazônia Legal identificaram “Mahanarva spectabilis” (Distant, 1909) como espécie impactante em pastagens. Nesse trabalho, objetivou-se analisar a variabilidade genética de 13 espécimes de “M. spectabilis” coletados em duas pastagens no Cerrado (cinco em “Brachiaria brizantha” cv. Marandú em Tocantins e oito em “Cynodon” no Distrito Federal), com base em características morfológicas e marcadores moleculares RAPD. Características morfológicas relacionadas à coloração de tégminas e cabeça foram avaliadas, observando-se diferentes padrões de coloração. O DNA genômico de cada espécime foi extraído e 10 primers decâmeros foram utilizados para a obtenção de marcadores moleculares RAPD. Os marcadores obtidos foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas entre os acessos e realizadas análises de agrupamento e dispersão gráfica. Foram obtidos 102 marcadores, sendo que apenas 23,5% dos mesmos foram monomórficos. A maioria dos espécimes coletados na pastagem de “Cynodon” no Distrito Federal ficaram agrupados, mostrando uma tendência de agrupamento dos espécimes do mesmo ponto de coleta e da mesma pastagem. Os resultados evidenciaram uma alta variabilidade genética dos espécimes de “Mahanarva spectabilis” tanto com base em características morfológicas como em marcadores moleculares RAPD.

PALAVRAS-CHAVE

marcadores RAPD, cigarrinha das pastagens, características morfológicas

MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL GENETIC VARIABILITY OF “MAHANARVA SPECTABILIS” (DISTANT, 1909) IN TWO SAVANNA PASTURE GRASSES

ABSTRACT

"*Mahanarva spectabilis*" (Distant, 1909) was identified as important pest in pasture grasses. In this work, the morphological and molecular genetic variability of 13 specimens (five specimens from "*Brachiaria brizantha*" cv. Marandu grown in Tocantins and eight specimens from "*Cynodon*" grown in Distrito Federal) were characterized. Morphological characters of tegmina and head color were analyzed. Different morphological patterns were observed. For each specimen, genomic DNA was extracted and RAPD markers were obtained. Ten decamer primers were used. These primers generated 102 RAPD markers, of which 24 (23.5%) were polymorphic. These markers were transformed into a binary matrix data in order to estimate genetic distances between the specimens and for cluster and graphical dispersion analysis. Most specimens collected in *Cynodon* pasture in Federal District were grouped together, showing that the site where the specimens were collected had more influence in the grouping analysis than morphological characters. The results showed high molecular genetic variability among specimens of *Mahanarva spectabilis* considering both RAPD markers and morphological criteria.

KEYWORDS

RAPD markers, spittlebug, morphological characters

INTRODUÇÃO

As cigarrinhas são uma das principais pragas das pastagens, causando grande prejuízo à pecuária nacional, reduzindo a capacidade de suporte e degradando pastagens formadas. No Brasil, são citadas as espécies "*Deois flavopicta*", "*D. shach*" e "*Notozulia entreriana*" como as cigarrinhas-das-pastagens de maior impacto econômico (Valerio et al, 1993). Entretanto, relatos recentes têm indicado a ocorrência do gênero "*Mahanarva*" em pastagens de "*Brachiaria brizantha*" cv. Marandú, na região de Cerrado e áreas de transição, localizadas na Amazônia Legal (Valentim e Andrade, 2004). Estudos sobre o gênero "*Mahanarva*" em gramíneas forrageiras no Brasil carecem ainda de mais informações relacionadas ao impacto econômico, à identificação em nível de espécie, aspectos da sua bioecologia, sua distribuição geográfica, bem como informações sobre a variabilidade genética inter e intra-específica. Levantamentos recentes sobre ocorrência, mapeamento e estudos taxonômicos de "*Mahanarva*" no Cerrado e Amazônia Legal identificaram "*Mahanarva spectabilis*" (Distant, 1909) como a espécie impactante em pastagens (Paula-Moraes et al., 2006). Nesse trabalho, objetivou-se analisar a variabilidade genética de espécimes de "*M. spectabilis*" em duas pastagens no Cerrado, com base em características morfológicas e marcadores moleculares RAPD.

MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais genéticos analisados no presente trabalho foram 13 espécimes adultos de "*M. spectabilis*", sendo cinco coletados em uma pastagem de "*Brachiaria brizantha*" cv. Marandú no Estado de Tocantins e oito em uma pastagem de "*Cynodon*" no Distrito Federal (Tabela 1). Um espécime adulto identificado como "*Mahanarva spectabilis*", por taxonomista do grupo, foi utilizado como controle e um espécime de "*Deois flavopicta*" foi utilizado como outgroup. Características morfológicas relacionadas à coloração de tégminas e cabeça foram avaliadas em cada espécime. Amostras de DNA genômico de cada espécime foram extraídas utilizando o método do CTAB, com modificações (Faleiro et al., 2003), e amplificadas pela técnica de RAPD. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13 µL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, 100 µM de cada um dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 µM de um "primer" (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 15 ng de DNA. Para obtenção dos marcadores RAPD foram utilizados 10 primers decâmeros: (OPD-04, OPD-07, OPD-16, OPE-20, OPF-01, OPF-14, OPF-17, OPG-08, OPH-04, OPH-12). As amplificações foram efetuadas em termociclador programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte seqüência: 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 35 °C e 90 segundos a 72 °C. Após os 40 ciclos, foi feita uma

etapa de extensão final de seis minutos a 72 °C, e finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C. Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 ul de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%) e glicerol (60%) em água. Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio, submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas, a 90 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta. Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas entre os diferentes espécimes, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei & Li, utilizando-se o Programa Genes (Cruz, 1997). A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar a análise de agrupamento, utilizando o método do UPGMA, e dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS e do Programa Statistica (Statsoft Inc., 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 13 espécimes de “*Mahanarva spectabilis*” apresentaram diferentes características morfológicas (Tabela 1), muitas diferentes da espécie controle identificado por taxonomista do grupo. Apesar disso, todos os espécimes analisados nesse trabalho foram identificados, pelo taxonomista do grupo, como “*M. spectabilis*”. Diferentes colorações de tégminas e de cabeça foram observadas, evidenciando a variabilidade genética intra-específica. Com relação à variabilidade genética molecular, os 10 primers decâmeros geraram um total de 102 marcadores RAPD, perfazendo uma média de 10,2 marcadores por primer. Dos 102 marcadores, apenas 24 (23,5%) foram monomórficos para “*M. spectabilis*”. A alta média de marcadores por primer e porcentagem de marcadores polimórficos evidenciam uma alta variabilidade genética dos espécimes. As distâncias genéticas entre os 15 espécimes variaram entre 0,057 e 0,725 (dados não mostrados). Como esperado, as maiores distâncias genéticas foram verificadas entre os espécimes de “*M. spectabilis*” e o espécime de “*Deois flavopicta*” utilizado como outgroup. Entre os espécimes de “*M. spectabilis*”, a menor distância genética (0,057) foi verificada entre os espécimes P01-DF 1 e o P01-DF 3 e a maior distância (0,307) entre os espécimes P16-TO 3 e P01-DF 8. O espécime P16-TO 3 foi o que apresentou maior média de distâncias genéticas entre os espécimes de “*M. spectabilis*” analisados nesse trabalho. Não houve uma relação entre as distâncias genéticas e as diferenças morfológicas dos espécimes. Uma possível explicação para este resultado é que ao analisar características morfológicas e moleculares, estamos analisando diferentes regiões do genoma. Normalmente ao analisar características de pigmentação estamos acessando indiretamente um ou poucos genes localizados em regiões específicas do genoma, enquanto ao analisar os marcadores moleculares tipo RAPD estamos acessando um maior número de regiões gênicas distribuídas de forma aleatória no genoma. A análise de agrupamento realizada com base nas distâncias genéticas evidencia a separação genética da espécie “*M. spectabilis*” e a “*D. flavopicta*” utilizada como outgroup (Figura 1). Outra observação é que a maioria dos espécimes coletados na pastagem de “*Cynodon*” no Distrito Federal ficaram agrupados. Esta tendência de agrupamento dos espécimes do mesmo ponto de coleta e da mesma pastagem também é evidenciada no gráfico de dispersão (Figura 2). Os espécimes coletados na pastagem de “*Brachiaria*” em Tocantins apresentaram uma maior variabilidade genética quando comparados com os espécimes coletados no Distrito Federal. Uma possível explicação para a maior variabilidade dos espécimes coletados em Tocantins é uma ocorrência generalizada de “*M. spectabilis*” em extensas áreas de pastagens nessa região, o que não foi verificado para os espécimes coletados no Distrito Federal, já que a ocorrência de “*M. spectabilis*” é em uma na área de “*Cynodon*”, a qual é margeada por áreas de culturas agrícolas de soja e milho.

CONCLUSÕES

Os resultados evidenciaram uma alta variabilidade genética dos espécimes de “*Mahanarva spectabilis*”

tanto com base em características morfológicas como em marcadores moleculares RAPD. Tal variabilidade deve ser levada em consideração em estudos taxonômicos, em avaliações de impacto econômico, aspectos de bioecologia e distribuição geográfica da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CRUZ, C. D. Programa Genes: Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: Editora UFV, 1997. 442p.
2. FALEIRO, F. G.; FALEIRO, A. S. G.; CORDEIRO, M. C. R. et al. Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico, No.92 6p., 2003.
3. PAULA-MORAES, S.V.; CARVALHO, G. S.; RAMOS, A. K. B.; AUAD, A. M.; TAKADA, S.; BARCELLOS, A. O. Ocorrência da cigarrinha-das-pastagens "Mahanarva spectabilis" (Distant, 1909) em gramíneas forrageiras e sua distribuição em áreas de Cerrado e na Amazônia Legal. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43, 2006, João Pessoa. Anais... Sociedade Brasileira de Zootecnia. CD-ROM. 2006. 5p (submetido)
4. STATSOFT, INC. . STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa. 1999.
5. VALENTIM, J. F.; ANDRADE, C. M. S. Perspectives of grass-legume pastures for sustainable animal production in the tropics. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande, MS. Anais..., Sociedade Brasileira de Zootecnia. CD-ROM. 2004.
6. VALÉRIO, J. R.; KOLLER, W. W. Proposição para o manejo integrado das cigarrinhas-das-pastagens. Pasturas Tropicales, Cali, v. 15, p. 583-590, 1993.