

ANÁLISES MOSFOMÉTRICA, MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Ozopherus muricatus* Pascoe, 1872 (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

ANÁLISIS MOSFOMÉTRICO, MORFOLÓGICO Y MOLECULAR DE *Ozopherus muricatus* Pascoe, 1872 (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

MOSPHOMETRIC, MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR ANALYSIS OF *Ozopherus muricatus* Pascoe, 1872 (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

Ellen Rebecca Lopes de Oliveira
rebek_ta@hotmail.com

Analice Ferreira da Silva
ebek_ta@hotmail.com

Georgia Souza Peixinho
geopeixinho@gmail.com

Karlos Antônio Lisboa Ribeiro Júnior
rebek_ta@hotmail.com

Johnnatan Duarte de Freitas
rebek_ta@hotmail.com

Antônio Euzébio Goulart Santana
rebek_ta@hotmail.com

** Universidade Federal de Alagoas, Maceió/AL - Brasil

Resumo

O grande crescimento comercial do açaí gerou uma expansão das áreas cultivadas, com consequente aumento na incidência de pragas nestas plantações, é o caso do gorgulho *Ozopherus muricatus* Pascoe, 1872 (Coleoptera: Curculionidae). Este trabalho teve o objetivo de encontrar diferenças quantitativas na morfologia externa deste inseto que possibilitem a sua diferenciação sexual, otimizar um protocolo por meio de marcadores moleculares para adultos de *O. muricatus* e analisar a diversidade genética da população. Insetos adultos foram coletados em plantações de açaí localizadas no Município de Buritis, Rondônia. Foram realizadas medições do corpo de 30 insetos, e também medição e análise das antenas, utilizando microscopia eletrônica de varredura. Não existem diferenças entre machos e fêmeas de *O. muricatus* com relação ao comprimento total do corpo. Através da MEV foi possível observar que as antenas de *O. muricatus* em ambos os sexos são clavadas e geniculadas. Não existem diferenças no tamanho dos segmentos das antenas de machos e fêmeas. Foram observadas nas antenas de machos e fêmeas, sensilas tricóide e caética; As sensilas tricóides foram as mais numerosas. O antenômero terminal da antena (Clava) é o local onde se concentra o maior número de sensilas tricóides, apresentando também sensilas caéticas. Através desta pesquisa, foi realizado o primeiro registro de sequências depositadas no GenBank para a espécie *Ozopherus muricatus* Pascoe.

PALAVRAS CHAVE: *Euterpe oleracea*, receptores de insetos, ecologia química.

Resumen

El gran crecimiento comercial del açaí generó una expansión de las áreas cultivadas, con el consiguiente aumento de la incidencia de plagas en estas plantaciones, como el gorgojo *Ozopherus muricatus* Pascoe, 1872 (Coleoptera: Curculionidae). Este trabajo tuvo como objetivo encontrar diferencias cuantitativas en la morfología externa de este insecto que permita su diferenciación sexual, optimizar un protocolo a través de marcadores moleculares para adultos de *O. muricatus* y analizar la diversidad genética de la población. Se recolectaron insectos adultos de plantaciones de açaí ubicadas en el municipio de Buritis,

Rondônia. Se realizaron mediciones del cuerpo de 30 insectos, así como medición y análisis de las antenas, utilizando microscopía electrónica de barrido. No hay diferencias entre machos y hembras de *O. muricatus* en relación con la longitud total del cuerpo. A través de SEM fue posible observar que las antenas de *O. muricatus* en ambos sexos están clavadas y geniculadas. No hay diferencias en el tamaño de los segmentos de antena macho y hembra. Se observaron en las antenas de machos y hembras, sensilas tricoides y caéticas; Las sensillas tricoidales fueron las más numerosas. La antena terminal de la antena (Clava) es el lugar donde se concentra la mayor cantidad de sensillas tricoidales, presentando también sensillas caéticas. A través de esta investigación, se realizó el primer registro de secuencias depositadas en GenBank para la especie *Ozopherus muricatus* Pascoe.

PALABRAS CLAVE: *Euterpe oleracea*, receptores de insectos, ecología química.

Abstract

The great commercial growth of açaí generated an expansion of cultivated areas, with a consequent increase in the incidence of pests in these plantations, such as the weevil *Ozopherus muricatus* Pascoe, 1872 (Coleoptera: Curculionidae). This work aimed to find quantitative differences in the external morphology of this insect that allow its sexual differentiation, to optimize a protocol through molecular markers for adults of *O. muricatus* and to analyze the genetic diversity of the population. Adult insects were collected from açaí plantations located in the municipality of Buritis, Rondônia. Measurements of the body of 30 insects were carried out, as well as measurement and analysis of the antennae, using scanning electron microscopy. There are no differences between males and females of *O. muricatus* in relation to the total body length. Through SEM it was possible to observe that the antennae of *O. muricatus* in both sexes are claved and geniculated. There are no differences in the size of the male and female antenna segments. They were observed in the antennae of males and females, trichoid and chaetic sensillas; Trichoidal sensillae were the most numerous. The terminal antenna of the antenna (Clava) is the place where the greatest number of trichoidal sensillae is concentrated, also presenting chaetic sensillae. Through this research, the first record of sequences deposited in the GenBank for the species *Ozopherus muricatus* Pascoe was carried out.

KEYWORDS: *Euterpe oleracea*, insect receptors, chemical ecology.

INTRODUÇÃO

O grande crescimento comercial do açaí gerou uma expansão das áreas cultivadas, e como consequência aumento na incidência de pragas nestas plantações, é o caso do gorgulho *Ozopherus muricatus* Pascoe, 1872 (Coleoptera: Curculionidae) (SANTOS et al., 2018).

De acordo com a pesquisa realizada, existem poucos estudos sobre os métodos de biologia e controle de *O. muricatus*. A geração de informações voltadas para a diferenciação entre machos e fêmeas dessa espécie é um fator importante para apoiar estudos relacionados ao comportamento reprodutivo e a razão sexual, entre outros, além de contribuir significativamente para o desenvolvimento de métodos de controle dessa praga (SANTOS et al., 2018).

O estudo morfométrico pode auxiliar na descrição de insetos imaturos, na compreensão da influência da distância geográfica sobre a morfologia de uma espécie e na distinção da diferenciação sexual (CORDEIRO et al., 2011).

Um fator importante no estudo das interações inseto-planta são as estruturas de percepção química presentes no corpo dos insetos. Essas estruturas, conhecidas como sensilas, são encontradas nas antenas, podendo ocorrer também, em menor número, em outros apêndices da cabeça, como nas maxilas e nos palpos labiais, nos tarsos e no ovipositor (GIANNKAKIS; FLETCHER, 1985).

As informações sobre análise morfométrica, morfológica e molecular de pragas são fundamentais para o planejamento de monitoramento, e em função da falta de informação disponível sobre a morfometria e a percepção química presentes no corpo de *O. muricatus*, para posteriores estudos feromonais da praga, este trabalho teve o objetivo de encontrar diferenças quantitativas na morfologia externa deste inseto que possibilitem a sua diferenciação sexual, otimizar um protocolo por meio de marcadores moleculares para adultos de *O. muricatus* e analisar a diversidade genética da população.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e criação dos insetos

Insetos adultos foram coletados em plantações de açaí localizadas no Município de Buritis, Rondônia (Latitude: 10° 12' 42" S, Longitude: 63° 49' 43" W, Altitude: 200m, Área: 3286,6 quilômetros quadrado). Os insetos foram transportados para o Laboratório de Pesquisa e Recursos Naturais (LPqRN) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, em Rio Largo, AL. Os insetos adultos foram colocados em recipientes plásticos, em um total de 30 insetos por potes e alimentados três vezes por semana com pedaços de cana-de-açúcar, mantidos a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo: 12L:12E.

Como os insetos foram coletados no campo, a idade e a condição reprodutiva dos adultos não eram reconhecidas.

Medição dos insetos

Para a medição dos insetos foi utilizado paquímetro. O comprimento do corpo foi tomado da extremidade da parte anterior da cabeça até a extremidade do abdômen. Para obter a largura e espessura foi medida a distância umeral.

Análise molecular

Extração de DNA, Reação em cadeia da polimerase (PCR) e Sequenciamento.

O DNA genômico foi extraído das patas de cada indivíduo, usando método baseado no protocolo de CTAB adaptado (DOYLE; DOYLE, 1990). O DNA foi extraído de indivíduos da espécie morfológicamente identificada. Uma região genica denominada COI foi amplificada usando primer LCO-1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e o primer reverso HCO-2198 (5'-

TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3') (FOLMER et al. 1994). Cada amplificação foi realizada em 30 µL, que incluiu 1 µL de DNA, 2,5 µL 10 × tampão, 5 µL Q-solution 0,5 µL taq DNA Polymerase, 1,0 µL 2,5 mM dNTPmix, 0,5 µL 50 mM de cloreto de magnésio, 0,5 µL de cada primer (10 mmol) e de 18,5 µL de água duplamente destilada.

Os parâmetros da PCR foram 95 °C durante 3 min e 35 ciclos de 94 °C durante 30 s, 51 °C (para COI) por 40 s e 72 °C por 60 s, seguido por uma etapa final de extensão de 72 °C por 10 min. Para os produtos de PCR obtidos foram realizadas corridas em gel de agarose a 1,0 % usando brometo de etideo e visualizado em um sistema de imagem em gel. Os produtos de PCR mostrando bandas claras positivas foram purificados usando QIAquick® PCR Purification kits (de acordo com o protocolo dos fabricantes). Um máximo de duas PCR amostras positivas da espécie foram sequenciadas bidirecionalmente na Macrogen inc. (Korea), Seoul, Coreia do sul.

Microscopia eletrônica de varredura das antenas

A Microscopia eletrônica de varredura das antenas foi realizada no Laboratório de Análise Instrumental do Departamento de Química do Instituto Federal de Alagoas. As antenas foram removidas de machos e fêmeas de *O. muricatus* ainda vivos e em seguida foram imersas em solução de glutaraldeído a 2% em tampão de fosfato (0,1M pH 7) durante dois minutos, posteriormente foram imersas por trinta segundos para desidratação numa série de soluções de etanol (50, 70, 80, 90 e 99%). Após a fixação e desidratação as antenas foram montadas em suportes de vidro, sobre fita adesiva elétrica de sulfato de carbono e metalizadas em um metalizador (Q150R ES, Quoron®). A corrente durante o processo de metalização com alvo de ouro foi de 10 mA durante 8 minutos. As antenas foram analisadas usando um microscópio eletrônico de varredura (INCAx-act, Oxford-instruments®) a 15 kV.

Análises Estatísticas

Os dados foram submetidos a análise de variância, e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. As análises de variância foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Medição dos insetos

Não existem diferenças significativas entre insetos machos e fêmeas de *O. muricatus*, com relação ao comprimento total do corpo (comprimento, espessura e largura), conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Estatística descritiva de medidas morfométricas de machos e fêmeas de *Ozopherus muricatus* Pascoe, 1872 (Coleoptera: Curculionidae).

| Comprimento (cm) | N | Mínimo | Máximo | Média ^(DP) | CV (%) |
|-------------------------|----|--------|--------|------------------------|--------|
| Macho | 30 | 2,70 | 3,40 | 3,06 ^(0,18) | 6,04 |
| Fêmea | 30 | 2,70 | 3,70 | 3,10 ^(0,21) | 6,77 |
| Espessura (cm) | | | | | |
| Macho | 30 | 0,80 | 1,10 | 0,89 ^(0,08) | 9,02 |
| Fêmea | 30 | 0,70 | 1,10 | 0,88 ^(0,08) | 9,79 |
| Largura (cm) | | | | | |
| Macho | 30 | 0,90 | 1,20 | 1,04 ^(0,06) | 6,51 |
| Fêmea | 30 | 0,90 | 1,30 | 1,04 ^(0,08) | 8,20 |

Foi aplicado o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Não houve diferença significativa entre os sexos.

Análise molecular

A amplificação por PCR utilizando o par de oligonucleotídeos LCO-1490/HCO-2198 direcionou a amplificação de um fragmento contendo aproximadamente 720 pares de base (pb) que corresponde a parte do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (mtCOI). Os produtos de amplificação foram visualizados em géis de agarose.

As seqüências obtidas foram submetidas ao GenBank através do procedimento de Blast Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), no entanto, não foram encontradas seqüências equivalente a espécie declarada. As seqüências oriundas do trabalho tiveram seu depósito registrado sob a identificação **MT270408**. Sendo estas as primeiras a serem depositadas para a espécie *Ozopherus muricatus* Pascoe.

Microscopia de varredura eletrônica (MEV) das antenas

Através da MEV foi possível observar que as antenas de *O. muricatus* em ambos os sexos são clavadas e geniculadas. Na tabela 2 é possível observar que não existem diferenças no tamanho dos segmentos das antenas (escapo, pedicelo e flagelo) de machos e fêmeas de *O. muricatus*. Cada antena é constituída por 3 segmentos: escapo, pedicelo e flagelo (figura 1). Foi possível observar que o pedicelo e o flagelo apresentam sensilas, diferente do escapo, o qual não possui (Figura 2). Dois tipos de sensilas foram observadas nas antenas de machos e fêmeas de *O. muricatus*, tricóide e caética (Figura 2, 3 e 4).

Tabela 2: Tamanhos do escapo, pedicelo e flagelo das antenas de machos e fêmeas de *O. muricatus*

| Parte da antena | Macho (mm) | Fêmea (mm) | CV (%) |
|-----------------|-------------------|-------------------|--------|
| Escapo | 3,74 ^a | 3,38 ^a | 8,60 |
| Flagelo | 4,00 ^a | 4,03 ^a | 5,10 |
| Pedicelo | 0,97 ^a | 1,01 ^a | 6,77 |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 1. Antena inteira de fêmea (A) e macho (B) de *O. muricatus*.

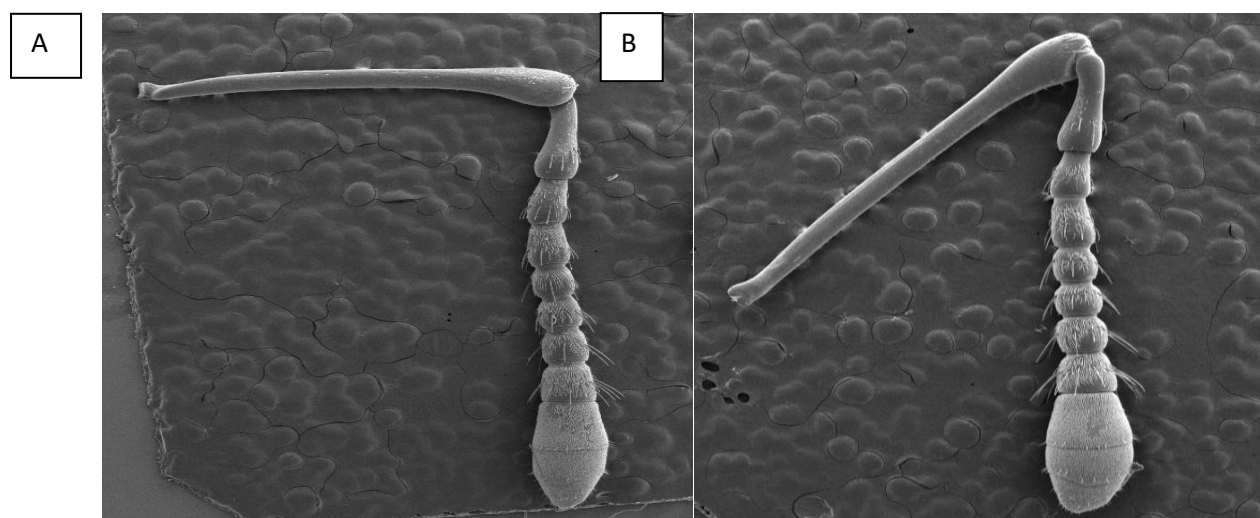
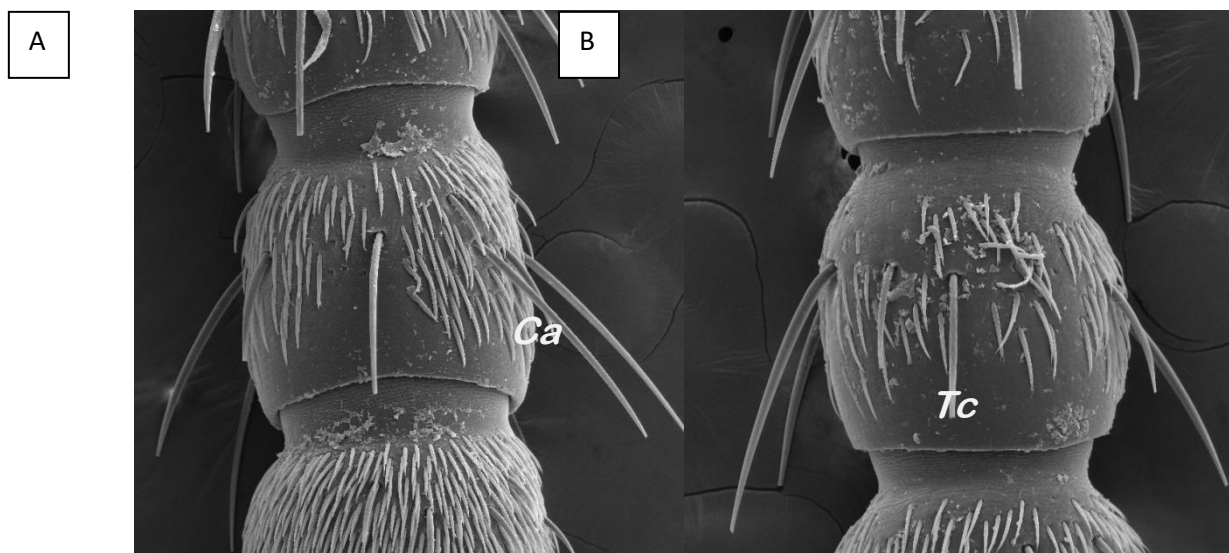


Figura 2. Antenômerode fêmea (A) e macho de *O. muricatus* (B) com a presença de sensilas caética e tricóide. **Ca** – Caética; **Tc** – Tricoide.



As sensilas tricoides foram as mais numerosas dentre os tipos de sensilas identificadas nas antenas de *O. muricatus* (Figura 3). O antenômero terminal da antena (Clava) é o local onde se concentra o maior número de sensilas tricoides, apresentando também sensilas caéticas (Figura 3 e 4).

Figura 3. Antenômero terminal da antena (Clava) de fêmea de *O. muricatus* com a presença de sensilas tricoides (Tc) e caética (Ca).

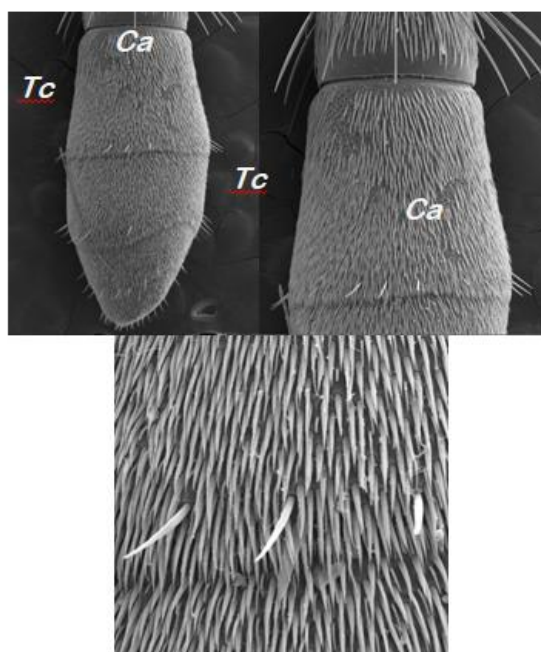
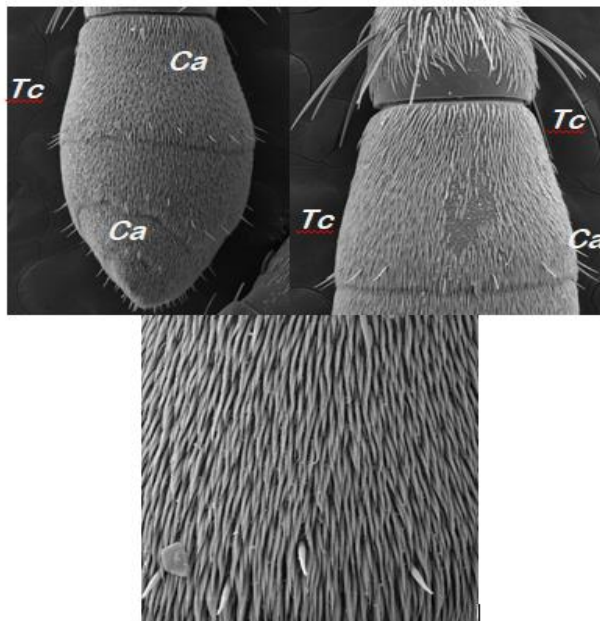


Figura 4. Antenômero terminal da antena (Clava) de macho de *Ozopherus muricatus* com a presença de sensilas tricoides (Tc) e caética (Ca).



As características externas observadas em outras espécies de adultos de curculionídeae, que podem caracterizar dimorfismo sexual, como o comprimento e largura do rostró, inserção das antenas, presença ou ausência de pelos no rostró ou em outras partes do corpo que podem caracterizar o dimorfismo entre os sexos (BARRETO; ANJOS, 1999; BARRETO; ROSADO-NETO, 2012), não foram encontradas em *O. muricatus* concordando com as observações de Vaurie (1972).

Externamente as sensilas possuem um eixo cuticular de vários tamanhos e formas, as diferenças morfológicas estão relacionadas à sua função (HARTENSTEIN, 2005).

Não existem diferenças entre os tipos de sensilas observadas para machos e fêmeas de *O. muricatus*, ambos possuem sensilas quimiorreceptoras, indicando que ambos os sexos podem responder aos compostos voláteis presentes no feromônio desta praga. Em curculionídeos, a maioria dos feromônios relatados são produzidos pelos machos e usualmente atrai ambos os sexos, por isso são conhecidos como feromônios de agregação (AMBROGI et al., 2009).

As sensilas tricoides, são longas, largas na base e seu diâmetro diminui de tamanho à medida que se aproxima do ápice. De acordo com Hartenstein (2005), as sensilas tricoides atuam principalmente como quimiorreceptores (receptores olfativos). Constatou-se que esse tipo de sensila aparece em maior quantidade nas antenas de ambos os sexos.

As sensilas caéticas são retas aparentam-se com cerdas, são largas na base e afiladas na porção distal. São distribuídas principalmente entre as sensilas tricoides, ao longo do flagelo. Esse tipo de sensila

foi observado em antenas de machos e fêmeas de *O. muricatus*. Segundo Hartenstein (2005), as sensilas caéticas estão relacionadas principalmente a função mecanorreceptora, entretanto essas sensilas também podem atuar como quimiorreceptoras.

CONCLUSÃO

Não existem diferenças entre machos e fêmeas de *O. muricatus* com relação ao comprimento total do corpo. Foi realizado o primeiro registro de sequências depositadas no GenBank para a espécie *Ozopherus muricatus* Pascoe. Através da MEV foi possível observar que as antenas de *O. muricatus* em ambos os sexos são clavadas e geniculadas. Não existem diferenças no tamanho dos segmentos das antenas de machos e fêmeas e nem no tipo de sensilas. Foram observadas nas antenas de machos e fêmeas, sensilas tricoide e caética. As sensilas tricoides foram as mais numerosas e o antenômero terminal da antena (Clava) é o local onde se concentra o maior número de sensilas tricoides, apresentando também sensilas caéticas.

Antenas de machos e fêmeas de *O. muricatus* possuem sensilas quimiorreceptoras, indicando que ambos os sexos podem responder aos estímulos químicos provenientes dos semioquímicos e o antenômero terminal da antena (Clava) é indicado para estudos eletroantenográficos.

Referências

- AMBROGI, B. G. A.; VIDAL, D. M.; ZARBIN, P. H. G.; ROSADO-NETO G. H. Feromônios de agregação em curculionidae (insecta: coleoptera) e sua implicação taxonômica. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2151-2158, 2009.
- BARRETO, M.R.; LINO Neto, J.; ANJOS, N. Dimorfismo e razão sexual em pupas e adultos de *Spermologus rufus* Boheman 1843 (Coleoptera: Curculionidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, n. 2, p. 358-364, 1999.
- BARRETO, M.R.; ROSADO-NETO, G.H. Dimorfismo sexual de *Onchoscelis germari* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae). **EntomoBrasilis**, v. 5, n. 3, p. 242-245, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.12741/ebrasilis.v5.i3.203>. Acesso em: 2 mar. 2020.
- CORDEIRO, G.; DOS ANJOS, N.; SILVA, C. R.; LEMES, P. G. Morfometria externa na diferenciação sexual de *Oncideres saga* (Dalman, 1823) (Coleoptera: Cerambycidae). **Revista Brasileira de Zoociência**. v. 13, p. 111-115, 2011.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.

FERREIRA, D. F. *Sisvar* - sistema de análise de variância para dados balanceados. Lavras: DEX/UFLA: **Software Estatístico**. 1999.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology Biotechnology**., v. 3, p. 294–299, 1994.

GIANNAKAKIS, A.; FLETCHER, B. S. Morphology and distribution of antennal sensilla of *Dacus tryoni* (Froggatt) (Diptera, tephritidae). **Australian Journal of Entomology**. v. 24, p. 31-35, 1985.

HARTENSTEIN, V. Development of insect sensilla. **Comprehensive Molecular Insect Science**. v. 1, p. 379-419, 2005.

SANTOS, N. L.; SILVA, K. B.; OLIVEIRA, E. R. L.; GOULART, H. F.; SANTANA, A. E. G.; GUZZO, E. C. Dimorfismo sexual em *Ozopherus muricatus* Pascoe, 1872 (Coleoptera: Curculionidae). **Arquivo do Instituto Biológico**. v. 85, p. 1- 5, 2018.

VAURIE, P. The weevil genera *Homalinotus* and *Ozopherus* of the neotropical Cholinae (Coleoptera, Curculionidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v. 152, p. 1-50, 1973.

Recebido em: 26/06/2020

Aceito em: 10/11/2020

Endereço para correspondência:
Nome Ellen Rebecca Lopes de Oliveira
Email rebek_ta@hotmail.com



Esta obra está licenciada sob uma [Licença Creative Commons Attribution 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)