

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Ana Carolina Ataíde Silveira

**Análise da diversidade genética em *Tenebrio molitor* por meio de marcadores  
moleculares ISSR**

**Montes Claros**

**2022**

Ana Carolina Ataíde Silveira

**Análise da diversidade genética em *Tenebrio molitor* por meio de marcadores moleculares ISSR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Saúde do Instituto de Ciências Agrárias- UFMG, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Alimentos e Saúde.

Área de Concentração: Alimentos, Microbiologia e Modulação Biomolecular.

Orientador: Prof. Dr. Junio Cota Silva

Coorientador: Prof. Dr. Demerson Arruda Sanglard

Montes Claros

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitora: Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-reitor: Alessandro Fernandes Moreira

Pró-reitor de Pesquisa: Mário Fernando Montenegro Campos

Pró-reitor adjunto de Pesquisa: André Ricardo Massensini

Pró-reitor de Pós-graduação: Fábio Alves da Silva Júnior

Pró-reitora adjunta de Pós-graduação: Silvia Helena Alencar

CURSO DE MESTRADO EM ALIMENTOS E SAÚDE

Coordenador: Sérgio Henrique Sousa Santos

Subcoordenadora: Bruna Mara Aparecida de Carvalho

Silveira, Ana Carolina Ataíde.

S587a  
2022

Análise da diversidade genética em tenebrio molitor por meio de marcadores moleculares issr [manuscrito] / Ana Carolina Ataíde Silveira. Montes Claros, 2022.  
72 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Área de concentração em Alimentos e Saúde. Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador(a): Junio Cota Silva.

Banca examinadora: Junio Cota Silva, Demerson Arruda Sanglard, Alcinei Místico Azevedo, Igor Viana Brandi.

Inclui referências: f. 40-44; 46-47.

1. Insetos comestíveis – Teses. 2. Tenebrio – Teses. 3. Alimentos - Melhoramento genético – Teses. I. Silva, Junio Cota. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 636.084.4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO EM ALIMENTOS E SAÚDE

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 24 dias do mês de fevereiro de 2022, às 14:00 horas, sob a Presidência do Professor Junio Cota Silva, Dr. Sc. (Orientador – UFMG/ICA) e com a participação dos Professores Demerson Arruda Sanglard, Dr. Sc. (Coorientador - UFMG/ICA), Alcinei Místico Azevedo, Dr. Sc. (UFMG/ICA) e Igor Viana Brandi, Dr. Sc. (UFMG/ICA) reuniu-se, por videoconferência, a Banca de defesa de dissertação da Discente **ANA CAROLINA ATAÍDE SILVEIRA**, aluna do Curso de Mestrado em Alimentos e Saúde. O resultado da defesa de dissertação intitulada: "Análise da diversidade genética em *Tenebrio molitor* por meio de marcadores moleculares ISSR" sendo a aluna considerada aprovada. E, para constar, eu, Professor Junio Cota Silva, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

**OBS.: A aluna somente receberá o título após cumprir as exigências onde a candidata deverá, após a aprovação de sua Dissertação ou Tese e da realização das modificações propostas pela banca examinadora, se houver, encaminhar à secretaria do Colegiado do Programa, com a anuência do(a) orientador(a), no mínimo 1 (um) exemplar impresso e 1 (um) exemplar eletrônico da dissertação no prazo máximo de 30 (trinta) dias.**



Documento assinado eletronicamente por **Junio Cota Silva, Presidente de comissão**, em 27/05/2022, às 11:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alcinei Místico Azevedo, Professor do Magistério Superior**, em 27/05/2022, às 12:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Igor Viana Brandi, Professor do Magistério Superior**, em 27/05/2022, às 14:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Demerson Arruda Sanglard, Professor do Magistério Superior**, em 15/06/2022, às 00:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1487851** e o código CRC **2F212566**.

## RESUMO

A utilização de insetos na alimentação de animais e humanos tem despertado grande interesse de órgãos governamentais e pesquisadores em todo o mundo, movidos pela necessidade de práticas agroindustriais mais sustentáveis. A espécie *Tenebrio molitor* reúne ótimas qualidades bromatológicas, configurando uma excelente fonte alternativa de proteína. Estudos de diversidade genética são muito relevantes para programas de melhoramento genético e também para compreensão de dinâmicas populacionais. Neste estudo, objetivou-se analisar a diversidade genética de *T. molitor* por meio de marcas moleculares amplificadas com oligonucleotídeos ISSR (Inter Simple Sequences Repeats) e procedimentos biométricos. Um protocolo de extração de DNA com adaptações foi aplicado. Efetuou-se reações de PCR (Polymerase Chain Reaction) no contexto de testes de gradientes de temperatura para 56 oligonucleotídeos ISSR, oriundos de uma coleção desenvolvida pela University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada). Aqueles que geraram polimorfismos foram usados na amplificação de uma coleção de 48 acessos de *T. molitor*, angariados de oito municípios brasileiros. Os dados moleculares prestaram-se nas comparações das dissimilaridades genéticas produzidas pelos índices de "Nei e Li", "Jaccard" e "Coincidência Simples", sendo a matriz do primeiro, também aplicada aos métodos de agrupamento "Hierárquico" (UPGMA) e de otimização de "Tocher". Dos 56 oligonucleotídeos testados, 34 apresentaram polimorfismos entre os acessos, sob temperaturas de anelamentos específicas. Estes, por sua vez, produziram 131 fragmentos usados na obtenção da matriz de dissimilaridade, a qual apontou elevada variabilidade geral entre os 48 acessos (11,24% a 65,45%). Considerando as dissimilaridades entre pares de acessos, 79 apresentaram valores superiores a 50%. Os métodos de agrupamento "Hierárquico" e otimização de "Tocher" discriminaram cinco e quatro grupos, respectivamente. Ao interpolar os dois procedimentos, observou-se o destacamento dos acessos 1, 15, 16 e 45; em relação aos demais. Estes resultados são de especial interesse para a escolha de genitores que potencializem efeitos heteróticos e populações segregantes em programas de melhoramento.

**Palavras-chave:** Alimentação alternativa, Dissimilaridade, ISSR, Coleção ativa, *Tenebrio*.

## ABSTRACT

The use of insects in animal and human food has aroused great interest from government agencies and researchers around the world, driven by the need for more sustainable agro-industrial practices. The species *Tenebrio molitor* has excellent bromatological qualities and ease of handling, configuring a great source of protein, mainly. No work has yet been carried out to estimate the genetic diversity of this insect, and this information is very relevant for efforts to improve and understand population dynamics. In this study, the objective was to analyze the genetic diversity of *T. molitor* through molecular markers amplified with ISSR (Inter Simple Sequences Repeats) oligonucleotides and biometric procedures. A DNA extraction protocol with adaptations was applied. PCR (Polymerase Chain Reaction) reactions were performed in the context of temperature gradient tests for 56 ISSR oligonucleotides, from a collection developed by the University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada). Those that generated polymorphisms were used to amplify a collection of 48 accessions of *T. molitor*, collected from eight Brazilian municipalities. Molecular data were used to compare the genetic dissimilarities produced by the indices of "Nei and Li", "Jaccard" and "Simple Coincidence", the matrix of the first being also applied to the "Hierarchical" clustering (UPGMA) and optimization of "Tocher". Of the 56 oligonucleotides tested, 34 showed polymorphisms between accessions, under specific annealing temperatures. These, in turn, produced 131 fragments used to obtain the dissimilarity matrix, which showed high general variability among the 48 accessions (11.24% to 65.45%). Considering the dissimilarities between pairs of accesses, 79 presented values greater than 50%. The "Hierarchical" clustering and "Tocher" optimization methods discriminated five and four groups, respectively. When interpolating the two procedures, accessions 1, 15, 16 and 45 were detached; in relation to others. These results are of special interest for the choice of parents that potentiate heterotic effects and segregating populations in breeding programs.

**Keywords:** Alternative food, Dissimilarity, ISSR, Active collection, *Tenebrio*.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições de amplificação via PCR (Polymerase Chain Reaction) para oligonucleotídeos ISSR, envolvendo populações de *Tenebrio molitor*.....12

Tabela 2: Oligonucleotídeos ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada).....12



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOD	-	Biochemical Oxygen Demand
CCC	-	Coefficiente de Correlação Cofenético
CTAB	-	Etyltrimethylammonium Bromide
DNA	-	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	-	Ethylenediaminetetraacetic Acid
FAO	-	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GENES	-	Aplicativo computacional em Genética e Estatística Experimental
H <sub>Oligo</sub>	-	Heterozygosity of Oligonucleotides
ISSR	-	Inter Simple Sequences Repeats
ONU	-	Organização das Nações Unidas
PVP	-	Polivinilpirrolidona
PCR	-	Polymerase Chain Reaction
PIC <sub>Oligo</sub>	-	Polymorphism Information Content of Oligonucleotides
TBE	-	Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM).
TE	-	Tris-Base-EDTA
Tris-HCL	-	Tris hydrochloride
UBC	-	University of British Columbia, Canada
UPGMA	-	Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVO GERAL.....	9
2.1. Objetivos específicos .....	9
3. METODOLOGIA.....	10
3.1. Material genético e estratégia de avaliação .....	10
3.2. Análises moleculares .....	10
3.2.1. Extrações de DNA.....	10
3.2.2. Testes de gradientes de temperaturas de anelamento.....	11
3.2.3. Condições de amplificação.....	12
3.2.4. Eletroforese e fotodocumentação .....	14
3.3. Análises biométricas baseadas em dados moleculares .....	14
4. PRODUTO CIENTÍFICO .....	15
5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46
7. ANEXOS .....	48

## 1. INTRODUÇÃO

O *Tenebrio molitor* é um inseto conhecido popularmente como "bicho da farinha", "tenébrio comum" ou "larva de besouro", pertencendo a ordem Coleoptera e família Tenebrionidae (Rumpold e Schlüter, 2013). Este possui metamorfose completa e seu ciclo de vida passa por quatro fases distintas: ovo, larva, pupa e adulto; sendo que sua fase larval é conhecida por conter uma maior fonte qualitativa e quantitativa de proteínas, já amplamente empregada na alimentação de diversas espécies animais, tais como peixes, répteis, pássaros e pequenos mamíferos insetívoros, proporcionando uma forma prática, econômica e nutritiva de alimentação (Linassi e Borghetti, 2011). A Organização das Nações Unidas (ONU) estima que a população humana global exceda o limite de 11 bilhões até o ano de 2.100. Portanto, fontes alternativas de alimentos e rações serão cada vez mais necessárias para a população mundial em constante crescimento (Van Huis, 2013; FAO, 2015).

Para Sosa e Fogliano (2017), os parâmetros de sustentabilidade têm se tornando cada vez mais importante no mundo em que vivemos. Desta forma, fontes alternativas de alimentos precisam ser utilizadas para substituir ingredientes tradicionais que sejam compreendidos como menos sustentáveis. Uma alternativa seria usar proteínas, lipídios e fibras de insetos comestíveis como matrizes alimentares, substituindo as já tradicionalmente utilizadas. Insetos comestíveis podem suprir aumento da demanda por proteína animal além de evitar o desmatamento para uso de pastagens, além disso, a produção de insetos tem se mostrado, mais sustentável do que a produção de gado por inúmeras razões, sendo elas as menores emissões de gases de efeito estufa, menor área de terra necessária, conversão de ração mais eficiente e potencial de crescimento orgânico (Van Huis, 2015).

Para o estudo da diversidade dentro da população ou entre acessos, a partir de informações geradas por marcadores moleculares, pode-se adotar técnicas de agrupamento ou de projeção de medidas de dissimilaridade (Arriel *et al.*, 2004; Bertan *et al.*, 2006; Cruz *et al.*, 2011). Em ambos os casos, torna-se necessária a matriz de dissimilaridade entre pares de indivíduos por meio de índices apropriado. Muitas metodologias estão disponíveis para quantificar e avaliar o grau de divergência genética a partir de informações moleculares. No entanto, Cruz *et al.* (2011) salientam que a abrangência dos estudos, de informações, de métodos e de material biológico, tem levado a certa dificuldade em escolher e aplicar corretamente as metodologias disponíveis e interpretar, convenientemente, o significado dos resultados das análises biométricas. Em muitas situações, o pesquisador está interessado em avaliar padrões de agrupamento, formular e testar hipóteses sobre a similaridade ou

diversidade obtida. Nesse sentido, a literatura especializada apresenta várias técnicas de agrupamento, que se distinguem pelo tipo de resultado a ser fornecido e pelos diferentes modos de definir a proximidade entre indivíduos e grupos deles. Nas análises de agrupamento, tem-se a pretensão de reunir os indivíduos em um determinado número de grupos, de modo que exista homogeneidade dentro de cada grupo e heterogeneidade entre eles (Ferreira, 2008; Cruz *et al.*, 2011; Mingoti, 2013).

Dentre os métodos de agrupamento, destacam-se os hierárquicos e os de otimização, pelo fato de serem bastante utilizados em estudos de divergência genética (Mohammadia e Prasanna, 2003). Nos métodos de otimização, os grupos são formados pela adequação de algum critério de agrupamento, enquanto que, nos hierárquicos, os indivíduos são agrupados por um processo que se repete em vários níveis, até que seja estabelecido o dendrograma (Mojena, 1977; Vasconcelos, 2007). Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo estimar a diversidade genética de uma população de *T. molitor* com base em dados moleculares produzidos por oligonucleotídeos ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), sistematizados em medidas de dissimilaridade e métodos de agrupamento.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Estimar a variabilidade genética de amostras de *Tenebrio molitor* apoiada em dados moleculares, como subsídio à formação de populações-base em um programa de melhoramento genético.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Montar uma coleção de trabalho a partir de lotes de *Tenebrio molitor* advindos de diferentes municípios brasileiros;
- Validar um protocolo de extração de DNA eficaz para *Tenebrio molitor*;
- Realizar varreduras de *amplicons* (locos) em genomas de acessos larvais, por meio de oligonucleotídeos ISSR;
- Estimar a diversidade *genética* por meio de padrões eletroforéticos - bandas (matrizes de dados binários) e ferramentas biométricas.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Material genético e estratégia de avaliação

Para a formação de uma coleção de trabalho envolvendo acessos de *Tenebrio molitor*, foram obtidos (lotes) de larvas advindas de distintos municípios brasileiros. Estas foram adquiridas de comércios varejistas especializados, como "casas veterinárias", "lojas de pescaria", agropecuárias e outros similares.

Os lotes foram cultivados individualmente em bandejas plásticas de polipropileno (12 L), com dimensões de 8,6 cm x 37,2 cm x 53,2 cm (altura x largura x comprimento); mantidas em incubadoras BOD (Biochemical Oxygen Demand) a 30°C, com ausência de luz. Como subsídio alimentar, foi adotada a cobertura das bases das bandejas com farelo de milho e fatias de *Sechium edule* ("chuchu"). De cada lote, foram tomadas, ao acaso, seis larvas para estudos moleculares, totalizando 48 acessos. As análises moleculares envolveram extrações de DNA e ampliações via PCR (Polymerase Chain Reaction) com 34 oligonucleotídeos ISSR, de escolhas randomizadas, oriundos da coleção UBC (University of British Columbia, Canada).

As larvas tiveram os padrões eletroforéticos (bandas nos géis) organizados em matrizes de dados binários, obtendo-se o complemento aritmético dos índices de "Nei e Li", "Jaccard" e "Coincidência Simples". Com base na matriz de dissimilaridade obtida de "Nei e Li", foram aplicados os métodos de agrupamento "Hierárquico" (UPGMA - Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average) e otimização de "Tocher", com subseqüentes ilustrações gráficas. Também estimou-se outros parâmetros sobre diversidade dos locos, tais como número de fragmentos polimórficos, PIC<sub>oligo</sub> (Polymorphism Information Content of Oligonucleotides), H<sub>oligo</sub> (Heterozygosity of Oligonucleotides), dentre outros desdobramentos (Cruz, 2006). Todos os procedimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Biotecnologia, localizado no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, *Campus* Regional Montes Claros.

#### 3.2. Análises moleculares

##### 3.2.1. Extrações de DNA

As extrações de DNA seguiram os procedimentos recomendados por Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações. Fragmentos de larvas de *T. molitor* foram macerados em microtubos de 1,5 mL, com o auxílio de um disruptor / homogeneizador de amostras

biológicas (Equipamento da marca Dremel, modelo 4000), sob capela de exaustão de gases. Durante o procedimento de maceração, em cada microtubo, houve a adição de 750 µL do tampão de extração [PVP 2% (m/v); Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM pH 8,0; NaCl 1,4 M; β-mercaptoetanol 0,2 % (v/v) e CTAB 2% (m/v)]. Em seguida, os microtubos foram incubados em banho-maria a 65°C por 45 min e, depois disso, adicionou-se aos mesmos, 750 µL de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1). Em seguida, para melhor efetividade do clorofórmio, foram efetuadas inversões suaves durante cinco min, sendo os microtubos centrifugados por 8 min (10.000 x g) (Equipamento da marca Hettich Zentrifugen, modelo Mikro 120). Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos, com a adição de 600 µL de isopropanol gelado, ficando em repouso durante 12 h sob refrigeração (4°C). Após este período, foram centrifugados novamente por 8 min (10.000 x g), de modo a formar "pellets", sendo o isopropanol (sobrenadante) descartado. Então, foram executadas as lavagens dos "pellets" com 300 µL de etanol PA (70%), durante três repetições. Após o descarte do etanol na terceira lavagem, os "pellets" foram ressuspensos com 300 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0) contendo Ribonuclease A e Proteinase K, ambas na concentração de 40 ug/mL. As ressuspensões ocorreram por incubação em banho-maria a 37°C, durante 45 min. Após isso, foram acrescentados, a cada microtubo, 30 µL de NaCl 5M e 220 µL de isopropanol, mantendo-os refrigerados (4°C) por outras 12 h. Após este período, foi realizada uma nova centrifugação por 8 min (10.000 x g) para a precipitação de "pellets". Novamente procedeu-se as lavagens dos "pellets" com 300 µL de etanol PA (70%), durante três repetições. Após o descarte do etanol na terceira lavagem, os "pellets" foram ressuspensos, em definitivo, com 300 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0). As concentrações de DNA das amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Equipamento da marca TECAN, modelo Infinite M Plex), por leitura da absorbância a 260 nm, sendo cada unidade de absorbância correspondente à concentração de 50 ng/mL de DNA fita dupla (Sambrook et al., 1989).

### **3.2.2. Testes de gradientes de temperaturas de anelamento**

Antes das execuções das amplificações propriamente, foram realizados testes de gradientes de temperaturas de anelamento, por meio de termocicladores com este recurso (Equipamentos da marca Eppendorf, modelo Nexus Gradient). As máquinas foram configuradas para o espectro de 45°C a 65°C, sendo utilizados os DNA's de 02 (dois) indivíduos aleatórios da população.

### 3.2.3. Condições de amplificação

Foram utilizados oligonucleotídeos ISSR nos procedimentos de amplificações das populações, cujas as condições estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Condições de amplificação via PCR (Polymerase Chain Reaction) para oligonucleotídeos ISSR, envolvendo populações de *Tenebrio molitor*.

Reagentes	Concentração de Trabalho	Concentração Final	Volumes por Reação
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	-	12,4 uL
MgCl <sub>2</sub>	20,0 mM	2,8 Mm	3,5 uL
Tris / KCl pH 8,3	100 mM / 500 mM	10 mM / 50 mM	2,5 uL
d'NTP (A, T, C, G)	2,5 mM (cada)	0,1 mM (cada)	1,0 uL
<i>Primer</i> ISSR	4,0 uM	0,4 uM	2,5 uL
<i>Taq</i> polimerase	1,0 un/uL	1,0 um	0,1 uL
DNA	10 ng/uL	30 ng	3,0 uL
<b>Total</b>			<b>25,0 uL</b>

As reações foram programadas em uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 5 min; seguida por 35 ciclos de [desnaturação (94°C / 1 min), anelamento (46°C a 59°C / 1 min) e extensão (72°C/2 minutos)]; e uma fase de extensão final de 72°C por 7 min. Logo após essas ciclagens, o aparelho conserva as reações a 4°C, até a retirada das amostras. Os oligonucleotídeos ISSR utilizados para as amplificações, compõem uma coleção da UBC (University of British Columbia, Canada) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada).

Nº	Sequência 5' → 3'	Nº	Sequência 5' → 3'
801	ATA TAT ATA TAT ATA TT	851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG
802	ATA TAT ATA TAT ATA TG	852	TCT CTC TCT CTC TCT CRA
803	ATA TAT ATA TAT ATA TC	853	TCT CTC TCT CTC TCT CRT
804	TAT ATA TAT ATA TAT AA	854	TCT CTC TCT CTC TCT CRG
805	TAT ATA TAT ATA TAT AC	855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT
806	TAT ATA TAT ATA TAT AG	856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA
807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	858	TGT GTG TGT GTG TGT GRT
809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	859	TGT GTG TGT GTG TGT GRC

N = (A, G, C, T); R = (A, G); Y = (C, T); B = (C, G, T) (I. e. not A); D = (A, G, T) (I. e. not C); H = (A, C, T) (I. e. not G); V = (A, C, G) (I. e. not T).

Tabela 2. Continuação.

Nº	Sequência 5' → 3'	Nº	Sequência 5' → 3'
810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	860	TGT GTG TGT GTG TGT GRA
811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	861	ACC ACC ACC ACC ACC ACC
812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC
813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	863	AGT AGT AGT AGT AGT AGT
814	CTC TCT CTC TCT CTC TA	864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	865	CCG CCG CCG CCG CCG CCG
816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC
817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	867	GGC GGC GGC GGC GGC GGC
818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	868	GAA GAA GAA GAA GAA GAA
819	GTG TGT GTG TGT GTG TA	869	GTT GTT GTT GTT GTT GTT
820	GTG TGT GTG TGT GTG TC	870	TGC TGC TGC TGC TGC TGC
821	GTG TGT GTG TGT GTG TT	871	TAT TAT TAT TAT TAT TAT
822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	872	GAT AGA TAG ATA GAT A
823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	873	GAC AGA CAG ACA GAC A
824	TCT CTC TCT CTC TCT CG	874	CCC TCC CTC CCT CCC T
825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	875	CTA GCT AGC TAG CTA G
826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	876	GAT AGA TAG ACA GAC A
827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	877	TGC ATG CAT GCA TGC A
828	TGT GTG TGT GTG TGT GA	878	GGA TGG ATG GAT GGA T
829	TGT GTG TGT GTG TGT GC	879	CTT CAC TTC ACT TCA
830	TGT GTG TGT GTG TGT GG	880	GGA GAG GAG AGG AGA
831	ATA TAT ATA TAT ATA TYA	881	GGG TGG GGT GGG GTG
832	ATA TAT ATA TAT ATA TYC	882	VBV ATA TAT ATA TAT AT
833	ATA TAT ATA TAT ATA TYG	883	BVB TAT ATA TAT ATA TA
834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	884	HBH AGA GAG AGA GAG AG
835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	885	BHB GAG AGA GAG AGA GA
836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	886	VDV CTC TCT CTC TCT CT
837	TAT ATA TAT ATA TAT ART	887	DVD TCT CTC TCT CTC TC
838	TAT ATA TAT ATA TAT ARC	888	BDB CAC ACA CAC ACA CA
839	TAT ATA TAT ATA TAT ARG	889	DBD ACA CAC ACA CAC AC
840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	890	VHV GTG TGT GTG TGT GT
841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	891	HVH TGT GTG TGT GTG TG
842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	892	TAG ATC TGA TAT CTG AAT TCC C
843	CTC TCT CTC TCT CTC TRA	893	NNN NNN NNN NNN NNN
844	CTC TCT CTC TCT CTC TRC	894	TGG TAG CTC TTG ATC ANN NNN
845	CTC TCT CTC TCT CTC TRG	895	AGA GTT GGT AGC TCT TGA TC
846	CAC ACA CAC ACA CAC ART	896	AGG TCG CGG CCG CNN NNN NAT G
847	CAC ACA CAC ACA CAC ARC	897	CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G
848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG	898	GAT CAA GCT TNN NNN NAT GTG G
849	GTG TGT GTG TGT GTG TYA	899	CAT GGT GTT GGT CAT TGT TCC A
850	GTG TGT GTG TGT GTG TYC	900	ACT TCC CCA CAG GTT AAC ACA

N = (A, G, C, T); R = (A, G); Y = (C, T); B = (C, G, T) (I. e. not A); D = (A, G, T) (I. e. not C); H = (A, C, T) (I. e. not G); V = (A, C, G) (I. e. not T).



### 3.2.4. Eletroforese e fotodocumentação

Os produtos resultantes das ampliações foram separados por eletroforese horizontal com géis de agarose 1,2% (m/v), imersos em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM), seguindo procedimentos adaptados de Sambrook et al. (1989). No momento da aplicação, foram adicionados, à cada amostra, 3 µL do corante tipo IV [0,125% (m/v) de azul-de-bromofenol e 10% (m/v) de sacarose] e 5 uL de GelRed™. Os géis submetidos a uma carga de 120 V, por 3 h. Findadas as eletroforeses, os géis foram analisados por meio de um sistema de fotodocumentação (Equipamento da marca Loccus Biotecnologia, modelo L-PIX).

### 3.3. Análises biométricas baseadas em dados moleculares

Os dados foram analisados considerando-se a presença (1) ou a ausência (0) de bandas por meio dos recursos computacionais do programa GENES (Cruz, 2013). Os coeficientes para comparações dos cálculos de dissimilaridades genéticas foram o complemento aritmético do índice de "Nei e Li", "Jaccard" e "Coincidência Simples". Com base na matriz de dissimilaridade de "Nei e Li", foram efetuados os agrupamentos pelo método "Hierárquico" (UPGMA) e de otimização de "Tocher". Concomitantemente, efetuou-se o cálculo do coeficiente de correlação cofenético para ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma gerado. A diversidade dos locos foi estimada pelo número de fragmentos polimórficos,  $PIC_{oligo}$  e  $H_{oligo}$  (Cruz et al., 2011)

#### **4. PRODUTO CIENTÍFICO**

**Produto:** Análise da diversidade genética em *Tenebrio molitor* por meio de marcadores moleculares ISSR

## **Análise da diversidade genética em *Tenebrio molitor* por meio de marcadores moleculares ISSR**

A.C.A. Silveira<sup>1,2\*</sup>, D.A. Sanglard<sup>1\*</sup>, P.S. Amorim<sup>1</sup>, F.E.R. Batista<sup>1</sup> e J. Cota<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia, Centro de Pesquisas em Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, MG, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Centro de Pesquisas em Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, MG, Brasil

\* Both authors contributed equally to this article

Autor para correspondência: Ana Carolina Ataíde Silveira

E-mail: anacarolsilveira222@gmail.com

**RESUMO.** A utilização de insetos na alimentação de animais e humanos tem despertado grande interesse de órgãos governamentais e pesquisadores em todo o mundo, movidos pela necessidade de práticas agroindustriais mais sustentáveis, com destaque para *Tenebrio molitor*. Estudos de diversidade genética são muito relevantes para programas de melhoramento e também para compreensão de dinâmicas populacionais. Neste estudo, objetivou-se analisar a diversidade genética de *T. molitor* por meio de marcas moleculares ISSR (Inter Simple Sequences Repeats) e métodos biométricos. Efetuou-se testes de gradientes de temperatura para 56 oligonucleotídeos ISSR, visando a amplificação de 48 acessos de *T. molitor*, oriundo de oito municípios brasileiros. Os dados moleculares prestaram-se nas comparações das dissimilaridades genéticas produzidas pelos índices de "Nei e Li", "Jaccard" e "Coincidência Simples", sendo o primeiro o fornecedor da matriz aplicada aos métodos de agrupamento "Hierárquico" (UPGMA) e de otimização de "Tocher". Dos 56 oligonucleotídeos testados, 34 apresentaram polimorfismos entre os acessos sob temperaturas de anelamentos específicas. Estes produziram 131 fragmentos usados na obtenção da matrizes de dissimilaridade, as qual apontou elevada variabilidade geral entre os 48 acessos (11,24% a 65,45%). Considerando as dissimilaridades entre pares de acessos, 79 apresentaram valores superiores a 50%. Os métodos agrupamento "Hierárquico" e otimização de "Tocher" discriminaram cinco e quatro grupos, respectivamente. Ao interpolar os dois procedimentos, observou-se o destacamento dos acessos 1, 15, 16 e 45; em relação aos demais. Estes resultados são de especial interesse para a escolha de genitores que potencializem efeitos heteróticos e populações segregantes em programas de melhoramento.

**Palavras-chave:** Alimentação alternativa; Dissimilaridade; ISSR; Coleção ativa; *Tenebrio*.

## INTRODUÇÃO

A mudança no regime alimentar das populações dos diferentes países, caracterizados como intensivos, resultou em efeitos negativos sobre o meio ambiente, levando à necessidade de se encontrarem fontes alternativas de proteína para sustentar a população humana no futuro (FAO, 2015; Cavenaghi *et al.*, 2019). Uma das alternativas seriam as proteínas de insetos, uma vez que a sua produção é sustentável e apresenta custos reduzido e menor impacto ambiental comparada a outras fontes tradicionais de proteína animal. As Nações Unidas estimam que a população humana global exceda o limite de 11 bilhões até o ano de 2.100, sendo assim fontes alternativas de alimentos e rações são necessárias para a população mundial em constante crescimento (Van Huis, 2013; Sosa e Fogliano, 2017).

Os insetos têm uma excelente composição nutricional, não apenas devido à sua alta concentração de aminoácidos, quando comparados a outras fontes, mas também por seu potencial atender a princípios sustentáveis, saudáveis, acessíveis e palatáveis (Rutten *et al.* 2016; Berezina *et al.*, 2018). As larvas de *T. molitor* possuem considerável variação do conteúdo de proteína (13,68 a 22,32 g / 100 g porção comestível), o que viabiliza uma seleção contextualizada ao melhoramento genético. Além disso, também possui níveis atrativos de ácidos graxos poliinsaturados (Nowak *et al.*, 2016); minerais (Zinco / Magnésio); vitaminas (Piridoxina, Riboflavina, Folato e B12); o que configura um perfil nutricional superior ao das carnes bovina e de frango (Grau *et al.*, 2017). *Tenebrio molitor* é um inseto que infesta grãos armazenados, possui tamanho avantajado e, por isso, suas larvas são bastante usadas como referência de laboratório para testes com outros agentes biológicos. Esta espécie se caracteriza pela alta taxa de reprodução, cerca de 500 ovos por ovoposição (Van Huis, 2013). Não alça vôo e prefere sempre ambientes secos e escuros. São exigentes por calor e tem desenvolvimento ideal entre 26°C e 32°C.

Estudos de diversidade visam quantificar o nível de variabilidade total existente e a sua distribuição entre e/ou dentro de unidades taxonômicas, quer elas sejam indivíduos, acessos de banco de germoplasma, linhagens, populações de sistemas controlados de acasalamento dentre outros. Este conhecimento tem proporcionado importantes contribuições ao melhoramento genético, ao gerenciamento de bancos de germoplasma, à conservação de recursos genéticos e ao entendimento dos processos evolutivos das espécies (Cruz *et al.*, 2011).

De acordo com Reif *et al.* (2004), dentre as possibilidades de estudos da diversidade, destacam-se: determinação das inter-relações genéticas entre linhagens, e populações; identificação de combinações parentais adequadas à obtenção de híbridos altamente heteróticos e que possibilitem maior segregação em recombinações, com o aparecimento de transgressivos; introgressão de genes favoráveis provenientes dos acessos de bancos de germoplasma, componentes da base genética da espécie-alvo e; identificação de linhagens derivadas no processo de proteção. Para tais estudos, emprega-se o uso de marcadores moleculares. De modo geral, os marcadores devem ser confiáveis em termos de repetibilidade, ter baixo custo e serem fáceis e rápidos de analisar. Além disso, que permitam uma amostragem extensiva dos genomas de interesse ao nível de DNA, sem a influência do ambiente. Nesse sentido, os marcadores baseados em técnicas de PCR (Polymerase Chain Reaction) são mais atrativos, principalmente aqueles que apresentam grande polimorfismo (Barbosa-Neto e Bered, 1998; Faleiro, 2007).

Dentre os marcadores de DNA mais usados em estudos de diversidade e baseados em PCR, destaca-se o ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), o qual apresenta vantagens de facilidade na obtenção de dados, custo relativamente reduzido e aplicabilidade imediata a qualquer tipo de organismo, sem a necessidade de conhecimento prévio do seu genoma

(Nybom, 2004). Somado a isso, a técnica de ISSR também possui elevado grau de reprodutibilidade, resultante do comprimento dos oligonucleotídeos empregados (16 a 25 pb) e de condições de anelamento mais estrigentes (com temperaturas de anelamento entre 45°C e 65 °C (Borém e Caixeta, 2009; Turchetto-Zolet *et al.*, 2018). Os dados moleculares podem ser trabalhados por um extenso portfólio de ferramentas biométricas, com destaque para os índices de dissimilaridade e métodos multivariados de agrupamento (Arriel *et al.*, 2004; Mingoti, 2013; Bertan *et al.*, 2006; Cruz *et al.*, 2011).

A existência dos efeitos heteróticos é bem conhecida e explorada em diversas espécies de animais e vegetais (Falconer, 1987; Reif *et al.*, 2005; Aslam *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2016; Ertiro *et al.*, 2017, Leal *et al.*, 2018). No entanto, no caso de insetos e, mais especificamente, para *T. molitor*, não existem estudos de diversidade com base em marcadores moleculares e intentos de melhoramento genético (Cruz, 2005; Cruz *et al.*, 2011). Não obstante, a heterose é o fenômeno pelo qual os híbridos apresentam melhor desempenho (mais vigor ou maior produção) do que o de seus genitores. A heterose é mais bem pronunciada, quanto mais divergente (diferentes alelos de um mesmo loco) forem os acessos envolvidos em hibridações, o que poderia ser fixada por seleções recorrentes posteriores, em populações-base segregantes para melhoramento. O objetivo deste estudo, inédito para uma população de *T. molitor*, foi estimar sua variabilidade genética com base em dados moleculares obtidos de oligonucleotídeos ISSR, como subsídio à formação de populações-base segregantes em um programa de melhoramento genético.

## **METODOLOGIA**

### **Material genético e estratégia de avaliação**

Para a formação de uma coleção envolvendo acessos de *Tenebrio molitor*, foram obtidos lotes de larvas advindas de oito municípios brasileiros (Alfenas-MG, Catanduva-SP, Esmeraldas-MG, Marília-SP, Maringá-PR, Praia Grande-SP, São Paulo-SP e Tubarão-SC), adquiridos de comércios varejistas especializados no período entre 15/03/2021 e 14/04/2021. Os lotes foram cultivados individualmente em bandejas plásticas (12 L) de polipropileno [8,6 cm x 37,2 cm x 53,2 cm (altura x largura x comprimento)], mantidas em incubadoras BOD (Biochemical Oxygen Demand) a 30°C na ausência de luz. A alimentação dos insetos foi composta por farelo de milho em lâminas de 1 cm e fatias de *Sechium edule* ("chuchu"). De forma randomizada, tomou-se seis larvas de cada lote para análises de diversidade genética com base em marcas moleculares, totalizando 48 acessos estudados. Todos os procedimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Biotecnologia, localizado no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, *Campus* Regional Montes Claros.

### **Análises moleculares**

As extrações de DNA seguiram os procedimentos recomendados por Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações. Fragmentos de larvas de *T. molitor* foram macerados em microtubos de 1,5 mL, com o auxílio de um disruptor / homogeneizador de amostras biológicas (Equipamento da marca Dremel, modelo 4000), sob capela de exaustão de gases. Durante o procedimento de maceração, em cada microtubo, houve a adição de 750 µL do tampão de extração [PVP 2% (m/v); Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM pH 8,0; NaCl 1,4 M; β-mercaptoetanol 0,2 % (v/v) e CTAB 2% (m/v)]. Em seguida, os microtubos foram

incubados em banho-maria a 65°C por 45 min e, depois disso, adicionou-se aos mesmos, 750 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Em seguida, para melhor efetividade do clorofórmio, foram efetuadas inversões suaves durante cinco min, sendo os microtubos centrifugados por 8 min (10.000 x g) (Equipamento da marca Hettich Zentrifugen, modelo Mikro 120). Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos, com a adição de 600 µL de isopropanol gelado, ficando em repouso durante 12 h sob refrigeração (4°C). Após este período, foram centrifugados novamente por 8 min (10.000 x g), de modo a formar "pellets", sendo o isopropanol (sobrenadante) descartado. Então, foram executadas as lavagens dos "pellets" com 300 µL de etanol PA (70%), durante três repetições. Após o descarte do etanol na terceira lavagem, os "pellets" foram ressuspensos com 300 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0) contendo Ribonuclease A e Proteinase K, ambas na concentração de 40 ug/mL. As ressuspensões ocorreram por incubação em banho-maria a 37°C, durante 45 min. Após isso, foram acrescentados, a cada microtubo, 30 µL de NaCl 5M e 220 µL de isopropanol, mantendo-os refrigerados (4°C) por outras 12 h. Após este período, foi realizada uma nova centrifugação por 8 min (10.000 x g) para a precipitação de "pellets". Novamente procedeu-se as lavagens dos "pellets" com 300 µL de etanol PA (70%), durante três repetições. Após o descarte do etanol na terceira lavagem, os "pellets" foram ressuspensos, em definitivo, com 300 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0). As concentrações de DNA das amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Equipamento da marca TECAN, modelo Infinite M Plex), por leitura da absorbância a 260 nm, sendo cada unidade de absorbância correspondente à concentração de 50 ng/mL de DNA fita dupla (Sambrook et al., 1989).

As amplificações via PCR (Polymerase Chain Reaction) foram realizadas utilizando oligonucleotídeos ISSR (Inter Simple Sequences Repeats), desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada). De maneira prévia, executou-se



testes de gradientes de temperaturas de anelamento, por meio de termocicladores com este recurso (Equipamentos da marca Eppendorf, modelos Gradient). As máquinas foram configuradas para o espectro de 45°C a 65°C, sendo utilizados os DNA's de 02 (dois) indivíduos aleatórios da população. Neste contexto, foram escolhidas as temperaturas de anelamentos específicas para cada oligonucleotídeo, tal que proporcionassem a otimização de padrões eletroforéticos polimórficos. Cada reação continha 25 uL de mix (12,4 uL de H<sub>2</sub>O ultrapura; 3,5 uL de MgCl<sub>2</sub> 2,8 mM; 2,5 uL de Tris / KCl pH 8,3 10 mM / 50 mM; 1,0 uL de d'NTP; 2,5 uL de oligonucleotídeo ISSR 0,4 uM; 0,1 uL de *Taq* polimerase 1,0 un/uL e; 3,0 uL de DNA 10 ng/uL). As programações se deram por uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 5 min; seguida por 35 ciclos de [desnaturação (94°C / 1 min), anelamento (46°C a 59°C / 1 min) e extensão (72°C/2 minutos)]; e uma fase de extensão final de 72°C por 7 min. Logo após essas ciclagens, o aparelho conservou as reações a 4°C, até o acondicionamento em freezer -20 °C.

Os produtos resultantes das amplificações foram separados por eletroforese horizontal em géis de agarose 1,2% (m/v) e imersos em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM), seguindo procedimentos adaptados de (Sambrook et al., 1989). No momento da aplicação, foram adicionados, à cada amostra, 3 µL do corante tipo IV [0,125% (m/v) de azul-de-bromofenol e 10% (m/v) de sacarose] e 5 uL de GelRed™. Os géis foram submetidos a uma carga de 120 V, por 3 h. Subsequentemente, realizou-se a integração de imagens dos produtos eletroforéticos por meio de um sistema de fotodocumentação (Equipamento da marca Locus Biotecnologia, modelo L-PIX).

### **Análises biométricas baseadas nos dados moleculares**

Os dados foram analisados por meio de matrizes de dados binários, considerando-se a presença (1) e a ausência (0) de bandas aferidas durante as fotodocumentações. Os

coeficientes para os cálculos de dissimilaridades genéticas foram o complemento aritmético do índice de "Nei e Li" ( $S_{NL} = [2a / (2a + b + c)]$ ), "Jaccard" ( $S_j = [a / (a + b + c)]$ ) e "Coincidência Simples" ( $S_{CS} = [(a + d) / (a + b + c + d)]$ ); tal que "a" = número de coincidências do tipo (1)-(1) para cada par de acessos; "b" = número de discordâncias do tipo (1)-(0) para cada par de acessos; "c" = número de discordâncias do tipo (0)-(1) para cada par de acessos; "d" = número de coincidências do tipo (0)-(0) para cada par de acessos.

Concomitantemente, procedeu-se à análise de agrupamento pelo "Método Hierárquico" [Ligação média entre grupos (UPGMA)] e "Otimização de Tocher", com estruturação em dendrograma e dispersão gráfica, tendo como base a matriz de dissimilaridade gerada no índice de "Nei e Li" (Cruz *et al.*, 2011). No UPGMA, a distribuição dos indivíduos no dendrograma não segue um critério de formação de grupos, uma vez que o principal aspecto deste método consiste nas ramificações que são obtidas. Os indivíduos são agrupados aos pares, utilizando-se médias aritméticas da dissimilaridade. A matriz de distâncias geradas pelo coeficiente aritmético do índice de "Nei e Li" também foi utilizada para o agrupamento dos genótipos pelo método de otimização de Tocher. Adicionalmente, efetuou-se o cálculo do coeficiente de correlação cofenético para ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma gerado.

A diversidade genética dos locos foi estimada com base em H (Heterozygosity) estimado por  $2pq$  e no PIC (Polymorphism Information Content), que é uma estimativa utilizada para a avaliação do poder discriminatório de um loco. A informatividade do loco  $p_i$  é a frequência do alelo  $p$  no loco  $p_i$ , calculado pela equação:  $PIC = 1 - \sum p_i^2$ ; e a informatividade do primer  $p_{ij}$  é a frequência do alelo  $p$  do loco  $i$ , no oligonucleotídeo  $j$ , sendo calculada por  $PIC_{oligo} = 1 - \sum p_i^2 - \sum \sum p_i^2 p_j^2$  (Rezende *et al.*, 2009). Todas as análises foram executadas com o auxílio do programa computacionais GENES (Cruz, 2013).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

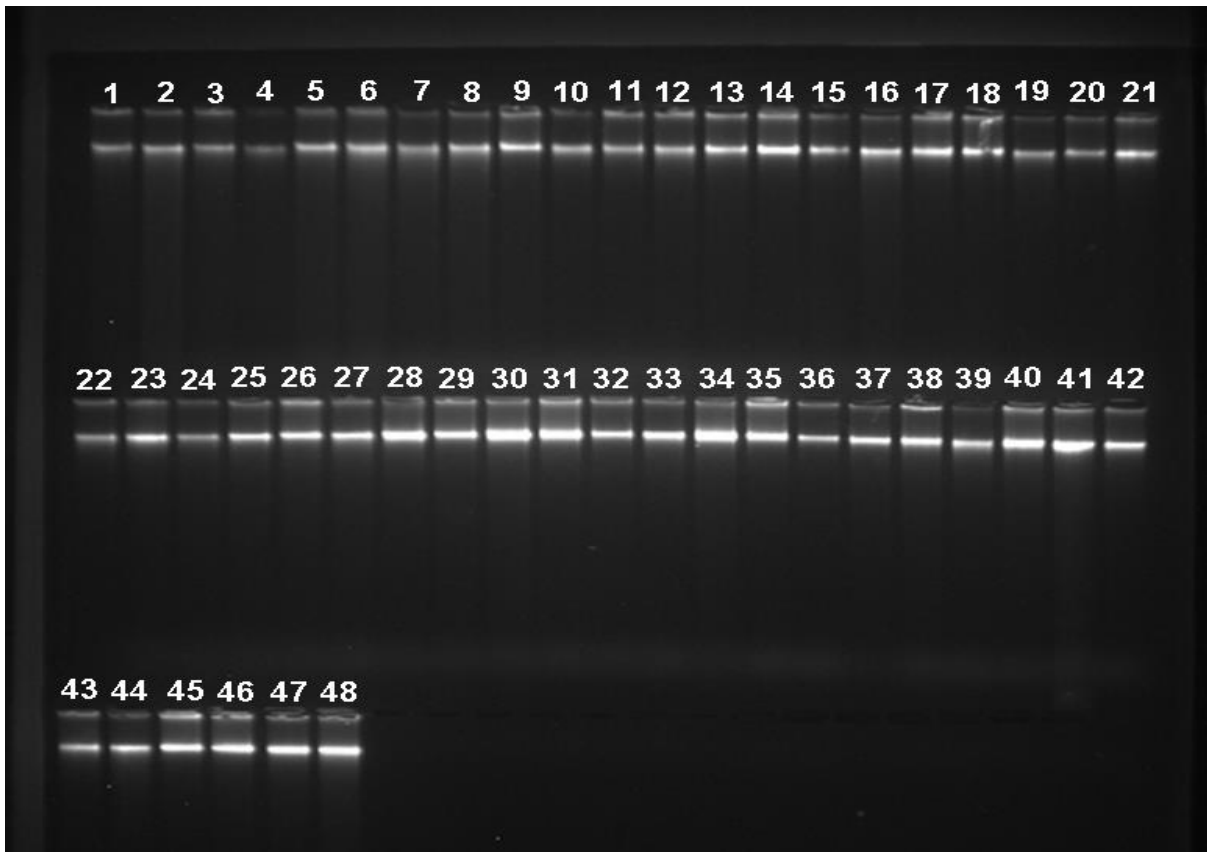
O protocolo adaptado de Doyle e Doyle (1990) foi eficaz na extração de DNA de larvas de *T. molitor*. As principais modificações na etapa de maceração, onde foi utilizado um homogeneizador de amostras biológicas diretamente nos microtubos acrescidos do tampão. Além disso, dois passos que envolvem armazenamento das amostras a 4°C foram substituídos por incubação em ultrafreezer (-75°C) por 15 min, reduzindo em 48h o processo. Após as extrações de DNA dos 48 acessos de *T. molitor*, procedeu-se os testes para averiguação das concentrações das amostras por espectrofotometria, visando a obtenção de amostras com 10ng/uL de DNA. Ferreira e Grattapaglia (1998) recomendam que a relação  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  esteja entre 1,2 a 2,0; intervalo este que englobou a maior parte das amostras obtidas (Tabela 1). De acordo com a tabela 1, todas as amostras de DNA alcançaram concentrações mínimas de 18 ng/uL, o que é 80% superior ao recomendado para ampliações com oligonucleotídeos ISSR (Goldwin, *et al.*, 1997).

Em caráter complementar foi realizada uma corrida eletroforética para averiguação da qualidade do DNA total extraído (Figura 1). Constatou-se a inexistência de arrastes, bem como notória nitidez (espessura) das bandas, as quais estão compatíveis com os dados da espectrofotometria (concentrações). A vantagem deste método adaptado de Doyle e Doyle (1990) está na dispensa da utilização do reagente fenol, entre outros de elevada toxicidade, sem comprometimento da pureza. As qualidades das reações de amplificação demonstraram que o protocolo de extração atendeu ao objetivo de sua validação. Os estudos de caracterização de polimorfismos genéticos em nível de DNA requerem amostras puras e suficientes para não inibir a ação de enzimas ou interferir na migração de géis sob eletroforese (Couch e Fritz, 1990; Welsh e McClelland, 1990).

**Tabela 1.** Resultados da quantificação por espectrofotometria de DNA's extraídos de larvas de *Tenebrio molitor*, tomadas aleatoriamente de 08 (oito) lotes oriundos de municípios brasileiros.

Nº do acesso (Lote)	A260 <sub>nm</sub>	A280 <sub>nm</sub>	A260 <sub>nm</sub> / A280 <sub>nm</sub>	[DNA] (ng/uL)	DNA (uL)*	TE (uL)*
1 (Alfenas-MG)	0,0581	0,0371	1,57	58,1	52,0	248,0
2 (Alfenas-MG)	0,0501	0,0259	1,93	40,6	74,0	226,0
3 (Alfenas-MG)	0,0406	0,0227	1,79	122,3	15,0	285,0
4 (Alfenas-MG)	0,0273	0,0144	1,89	18,9	159,0	141,0
5 (Alfenas-MG)	0,1223	0,0629	1,94	199,4	25,0	275,0
6 (Alfenas-MG)	0,0482	0,0248	1,94	171,2	18,0	282,0
7 (Catanduva-SP)	0,0189	0,0104	1,82	55,2	55,0	245,0
8 (Catanduva-SP)	0,0377	0,0197	1,91	41,7	72,0	228,0
9 (Catanduva-SP)	0,1994	0,1041	1,92	50,1	60,0	240,0
10 (Catanduva-SP)	0,0432	0,0223	1,94	27,3	110,0	190,0
11 (Catanduva-SP)	0,1712	0,087	1,97	48,2	63,0	237,0
12 (Catanduva-SP)	0,0635	0,0321	1,98	37,7	80,0	220,0
13 (Esmeraldas-MG)	0,0552	0,0245	2,25	43,2	70,0	230,0
14 (Esmeraldas-MG)	0,1212	0,0799	1,52	63,5	48,0	252,0
15 (Esmeraldas-MG)	0,0417	0,0206	2,02	21,2	142,0	158,0
16 (Esmeraldas-MG)	0,0700	0,0366	1,91	50,0	60,0	240,0
17 (Esmeraldas-MG)	0,0414	0,0287	2,48	46,4	64,0	236,0
18 (Esmeraldas-MG)	0,0414	0,0287	1,44	39,4	77,0	223,0
19 (Marília-SP)	0,0394	0,0237	1,66	36,1	84,0	216,0
20 (Marília-SP)	0,0508	0,0244	2,48	44,7	68,0	232,0
21 (Marília-SP)	0,1361	0,0855	1,59	166,3	19,0	281,0
22 (Marília-SP)	0,0769	0,0407	1,89	83,3	37,0	263,0
23 (Marília-SP)	0,1447	0,0729	1,98	107,8	28,0	272,0
24 (Marília-SP)	0,0488	0,0425	1,15	80,4	38,0	262,0
25 (Maringá-PR)	0,0963	0,0532	1,81	153,8	20,0	280,0
26 (Maringá-PR)	0,0983	0,0530	1,85	70,8	43,0	257,0
27 (Maringá-PR)	0,0833	0,0388	2,15	76,9	40,0	260,0
28 (Maringá-PR)	0,0884	0,0425	2,08	48,8	62,0	238,0
29 (Maringá-PR)	0,1078	0,0745	1,45	98,3	31,0	269,0
30 (Maringá-PR)	0,0613	0,0399	1,54	88,4	34,0	266,0
31 (Praia Grande-SP)	0,0804	0,0306	2,20	61,3	49,0	251,0
32 (Praia Grande-SP)	0,0440	0,0366	1,44	44,0	69,0	231,0
33 (Praia Grande-SP)	0,0504	0,0258	1,95	50,4	60,0	240,0
34 (Praia Grande-SP)	0,1255	0,0664	1,89	77,7	39,0	241,0
35 (Praia Grande-SP)	0,0777	0,0398	1,95	76,2	40,0	260,0
36 (Praia Grande-SP)	0,0489	0,0249	1,96	23,5	128,0	172,0
37 (São Paulo-SP)	0,0762	0,0465	1,64	134,9	23,0	277,0
38 (São Paulo-SP)	0,0909	0,0457	1,99	37,2	81,0	219,0
39 (São Paulo-SP)	0,0235	0,0118	1,99	33,2	91,0	209,0
40 (São Paulo-SP)	0,0589	0,0303	1,94	72,0	42,0	258,0
41 (São Paulo-SP)	0,1349	0,0719	1,88	125,5	24,0	276,0
42 (São Paulo-SP)	0,0572	0,0305	1,88	48,9	62,0	238,0
43 (Tubarão-SC)	0,0372	0,0201	1,85	90,9	34,0	266,0
44 (Tubarão-SC)	0,0504	0,0256	1,97	58,9	51,0	249,0
45 (Tubarão-SC)	0,0332	0,0162	2,05	57,2	53,0	247,0
46 (Tubarão-SC)	0,0482	0,026	1,85	50,4	60,0	240,0
47 (Tubarão-SC)	0,0720	0,0361	1,99	48,2	63,0	237,0
48 (Tubarão-SC)	0,0385	0,0203	1,90	38,5	78,0	222,0

TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0); \*Volumes em diluições compatíveis à preparação de 300 uL de DNA (10 ng/uL).



**Figura 1.** Teste de qualidade da extração de DNA total envolvendo 48 acessos (larvas) de *Tenebrio molitor*, oriundos de oito municípios brasileiros. Cada uma das amostras continha 10 uL de DNA total, 4 uL de GelRed™ e 3 uL de corante tipo IV, submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v), durante 3 h.

Foram conduzidos ensaios de gradientes de temperaturas de anelamento, como forma de averiguar as capacidades de ampliações com os diferentes oligonucleotídeos ISSR disponíveis. As temperaturas do gradiente foram intervaladas entre 45°C e 65°C, conforme recurso de randomização do próprio aparelho termociclador (Eppendorf, Nexus Gradient). Durante a execução das análises moleculares, foram testados 56 oligonucleotídeos ISSR, cujos os resultados são apresentados na Tabela 2. Deste total, 34 caracterizam-se como sendo amplamente polimórficos, sob as temperaturas de anelamento específicas apontadas nesse procedimento. Outros trabalhos também adotaram ensaios de gradientes de temperaturas de anelamento (Costa *et al.*, 2015; Souza, *et al.* 2018; Lopes *et al.*, 2020), evitando reações que não explorem o máximo dos polimorfismos potenciais ou, mesmo, com falhas completas.

**Tabela 2.** Resultados dos testes de gradiente de temperaturas de anelamento, envolvendo DNA's de larvas de *Tenebrio molitor* amplificados com oligonucleotídeos ISSR desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada).

<b>Reação de referência</b>	<b>Oligonucleotídeos ISSR (5' → 3')</b>	<b>Temperaturas de anelamento - Ta (°C)</b>
Placa 1	UBC 803 (ATA TAT ATA TAT ATA TC)	Não amplifica na espécie
	UBC 804 (TAT ATA TAT ATA TAT AA)	Não amplifica na espécie
	UBC 805 (TAT ATA TAT ATA TAT AC)	Não amplifica na espécie
	UBC 807 (AGA GAG AGA GAG AGA GT)	54°C
Placa 2	UBC 808 (AGA GAG AGA GAG AGA GC)	47°C
	UBC 812 (GAG AGA GAG AGA GAG AA)	47°C
	UBC 818 (CAC ACA CAC ACA CAC AG)	48°C
	UBC 820 (GTG TGT GTG TGT GTG TC)	46°C
Placa 3	UBC 823 (TCT CTC TCT CTC TCT CC)	46°C
	UBC 827 (ACA CAC ACA CAC ACA CG)	47°C
	UBC 830 (TGT GTG TGT GTG TGT GG)	54°C
	UBC 833 (ATA TAT ATA TAT ATA TYG)	Não amplifica na espécie
Placa 4	UBC 838 (TAT ATA TAT ATA TAT ARC)	Não amplifica na espécie
	UBC 842 (GAG AGA GAG AGA GAG AYG)	56°C
	UBC 848 (CAC ACA CAC ACA CAC ARG)	49°C
	UBC 850 (GTG TGT GTG TGT GTG TYC)	46°C
Placa 5	UBC 856 (ACA CAC ACA CAC ACA CYA)	56°C
	UBC 858 (TGT GTG TGT GTG TGT GRT)	59°C
	UBC 863 (AGT AGT AGT AGT AGT AGT)	Não amplifica na espécie
	UBC 867 (GGC GGC GGC GGC GGC GGC)	59°C
Placa 6	UBC 870 (TGC TGC TGC TGC TGC TGC)	Não amplifica na espécie
	UBC 876 (GAT AGA TAG ACA GAC A)	48°C
	UBC 883 (BVB TAT ATA TAT ATA TA)	Não amplifica na espécie
	UBC 884 (HBH AGA GAG AGA GAG AG)	46°C
Placa 7	UBC 886 (VDV CTC TCT CTC TCT CT)	51°C
	UBC 888 (BDB CAC ACA CAC ACA CA)	54°C
	UBC 892 (TAG ATC TGA TAT CTG AAT TCC C)	Não amplifica na espécie
	UBC 894 (TGG TAG CTC TTG ATC ANN NNN)	Não amplifica na espécie
Placa 8	UBC 895 (AGA GTT GGT AGC TCT TGA TC)	Não amplifica na espécie
	UBC 897 (CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G)	Não amplifica na espécie
	UBC 898 (GAT CAA GCT TNN NNN NAT GTG G)	Não amplifica na espécie
	UBC 900 (ACT TCC CCA CAG GTT AAC ACA)	Não amplifica na espécie
Placa 9	UBC 814 (CTC TCT CTC TCT CTC TA)	Monomórfico
	UBC 828 (TGT GTG TGT GTG TGT GA)	46°C
	UBC 829 (TGT GTG TGT GTG TGT GC)	46°C
	UBC 843 (CTC TCT CTC TCT CTC TRA)	Não amplifica na espécie
Placa 10	UBC 849 (GTG TGT GTG TGT GTG TYA)	47°C
	UBC 866 (CTC CTC CTC CTC CTC CTC)	56°C
	UBC 877 (TGC ATG CAT GCA TGC A)	Monomórfico
	UBC 879 (CTT CAC TTC ACT TCA)	Monomórfico
Placa 11	UBC 810 (GAG AGA GAG AGA GAG AT)	47°C
	UBC 816 (CAC ACA CAC ACA CAC AT)	46°C
	UBC 825 (ACA CAC ACA CAC ACA CT)	47°C
	UBC 836 (AGA GAG AGA GAG AGA GYA)	46°C
Placa 12	UBC 844 (CTC TCT CTC TCT CTC TRC)	Não amplifica na espécie
	UBC 847 (CAC ACA CAC ACA CAC ARC)	47°C
	UBC 853 TCT CTC TCT CTC TCT CRT)	Inconclusivo
	UBC 855 (ACA CAC ACA CAC ACA CYT)	47°C

Tabela 2. Continuação.

Reação de referência	Oligonucleotídeos ISSR (5' → 3')	Temperaturas de anelamento - Ta (°C)
Placa 13	UBC 864 (ATG ATG ATG ATG ATG ATG)	51°C
	UBC 865 (CCG CCG CCG CCG CCG CCG)	51°C
	UBC 874 (CCC TCC CTC CCT CCC T)	Não amplifica na espécie
	UBC 880 (GGA GAG GAG AGG AGA)	46°C
Placa 14	UBC 882 (VBV ATA TAT ATA TAT AT)	Não amplifica na espécie
	UBC 887 (DVD TCT CTC TCT CTC TC)	51°C
	UBC 889 (DBD ACA CAC ACA CAC AC)	51°C
	UBC 890 (VHV GTG TGT GTG TGT GT)	46°C

N = (A, G, C, T); R = (A, G); Y = (C, T); B = (C, G, T) (I. e. not A); D = (A, G, T) (I. e. not C); H = (A, C, T) (I. e. not G); V = (A, C, G) (I. e. not T).

Os 34 oligonucleotídeos selecionados nos testes de gradiente foram utilizados na análise de diversidade genética, envolvendo os 48 acessos de *T. molitor* colecionados. As reações efetuadas com estes iniciadores proporcionaram 131 fragmentos amplificados, dos quais 126 foram polimórficos (96,18%) e apenas cinco monomórficos (3,82%) (Tabela 3). Essa informação sugere alta variabilidade para a espécie que, sendo um inseto, remonta sua origem na magnitude de milhões de anos atrás (Misof *et al.*, 2014). Por conseguinte, quanto mais tempo uma espécie persiste no tempo, maior a expectativa de acúmulo de mutações em seus genomas (Ridley, 2006).

Ainda considerando os dados da Tabela 3, verifica-se que o número de fragmentos utilizados variou de dois (UBC 808, UBC 855, UBC 866 e UBC 855) a seis (UBC 847), sendo que do total de 34 oligonucleotídeos, 22 geraram pelo menos quatro fragmentos (64%). Embora UBC 847 tenha gerado maior número de fragmentos, seu PIC<sub>oligo</sub> foi relativamente baixo. O valor de PIC<sub>oligo</sub> é uma medida importante, pois fornece uma estimativa do poder discriminatório do marcador, por considerar não somente o número de alelos por loco, mas também a frequência relativa desses alelos (Jiao *et al.*, 2010). De maneira geral, os valores de PIC<sub>oligo</sub> são inferiores aos obtidos para H<sub>oligo</sub>. Neste estudo, a média de fragmentos polimórficos de cada oligonucleotídeo foi de 3,7590 (Tabela 3).

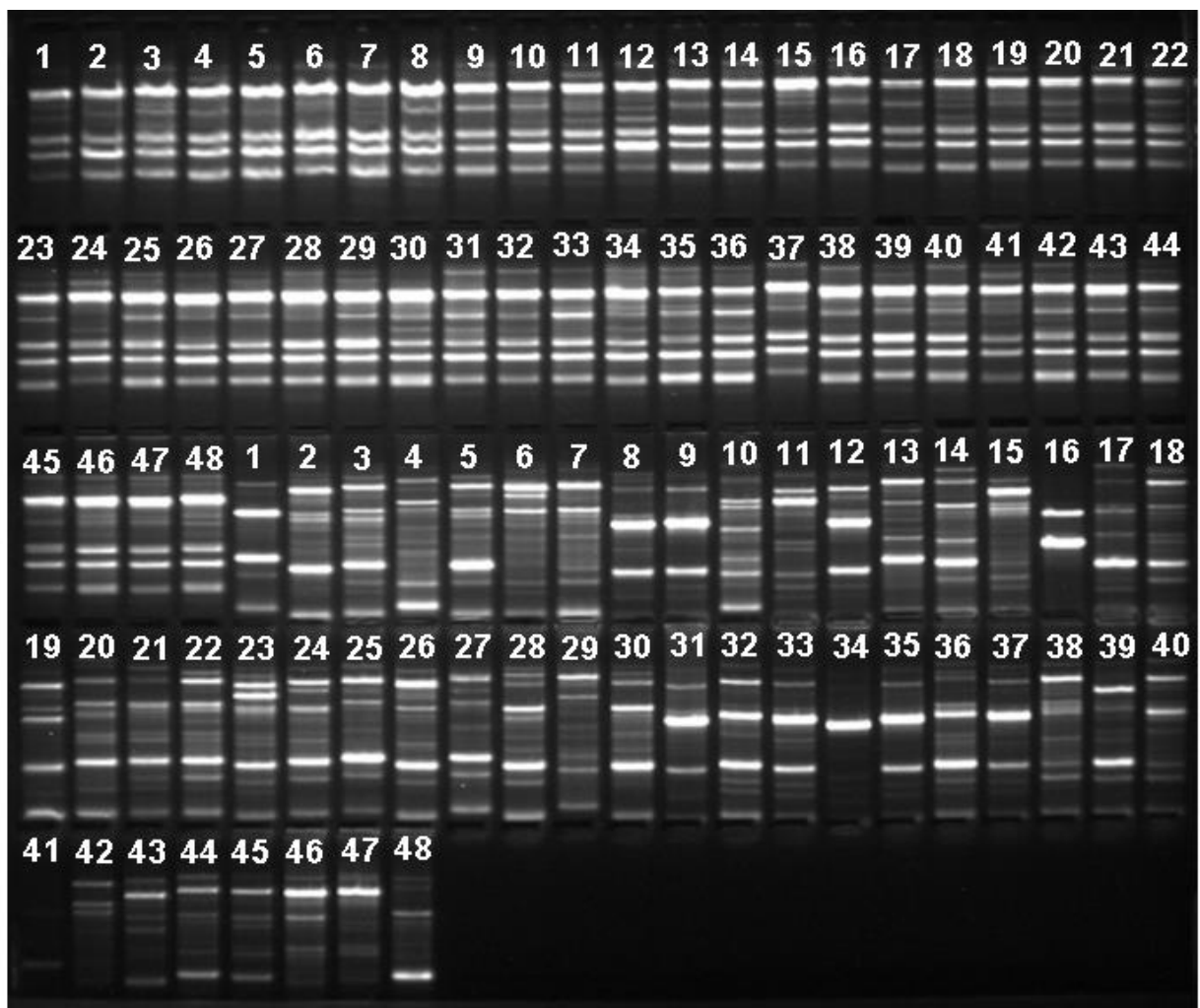
**Tabela 3.** Resultados dos testes de gradiente de temperaturas de anelamento, envolvendo DNA's de larvas de *Tenebrio molitor* amplificados com oligonucleotídeos ISSR desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada).

Oligonucleotídeos	Total de Fragmentos	Fragmentos Monomórficos	Fragmentos polimórficos	H <sub>Oligo</sub>	PIC <sub>Oligo</sub>
UBC 807	4	0	4	0,3985	0,3174
UBC 808	2	0	2	0,4065	0,3210
UBC 810	3	0	3	0,3407	0,2772
UBC 812	4	0	4	0,3420	0,2731
UBC 816	4	0	4	0,2321	0,1939
UBC 818	5	0	5	0,4553	0,3505
UBC 820	4	0	4	0,3574	0,2872
UBC 823	4	0	4	0,2563	0,2194
UBC 825	5	0	5	0,3942	0,3101
UBC 827	5	3	2	0,1674	0,1314
UBC 828	5	0	5	0,2696	0,2259
UBC 829	3	0	3	0,3783	0,3016
UBC 830	5	0	5	0,3893	0,3090
UBC 836	3	0	3	0,3179	0,2615
UBC 842	5	0	5	0,3030	0,2457
UBC 847	6	0	6	0,2328	0,2038
UBC 848	3	0	3	0,4466	0,3466
UBC 849	5	0	5	0,3039	0,2554
UBC 850	5	0	5	0,3028	0,2447
UBC 855	2	0	2	0,3963	0,3132
UBC 856	4	0	4	0,4640	0,3554
UBC 858	3	0	3	0,3795	0,3075
UBC 864	3	1	2	0,2809	0,2205
UBC 865	3	1	2	0,2765	0,2176
UBC 866	2	0	2	0,3075	0,2518
UBC 867	4	0	4	0,4210	0,3290
UBC 876	4	0	4	0,4825	0,3661
UBC 880	2	0	2	0,4961	0,3731
UBC 884	4	0	4	0,4787	0,3640
UBC 886	5	0	5	0,2759	0,2331
UBC 887	3	0	3	0,3690	0,2928
UBC 888	4	0	4	0,4491	0,3477
UBC 889	4	0	4	0,4332	0,3308
UBC 890	4	0	4	0,4557	0,3512
<b>Médias</b>	<b>3,8529</b>	<b>0,1471</b>	<b>3,7590</b>	<b>0,3606</b>	<b>0,2862</b>

Comparado a outros trabalhos sobre diversidade com a mesma coleção de oligonucleotídeos desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada) (Souza *et al.*, 2008; George *et al.*, 2009; Anand *et al.*, 2010; Rizkalla, *et al.*, 2012; Ghazalli *et al.*, 2015; Vieira *et al.*; 2015); tem-se que a média deste foi relativamente inferior. Uma possível explicação seria o fato deste estudo contabilizar apenas



os fragmentos com excelente nitidez e separação vertical nos géis, conforme ilustrado na Figura 2. Outra questão refere-se à natureza dos marcadores moleculares ISSR, os quais são classificados como dominantes. Embora não realizem a discriminação multialélica, foram pertinentes para o atendimento do objetivo principal acerca das estimativas de dissimilaridades, uma vez que não demandam conhecimento prévio do genoma ao qual sejam aplicados (Reddy *et al.*, 2002). Além disso, ao aplicar-se 34 oligonucleotídeos, vislumbra-se um número expressivo como modo de compensação aos potenciais discriminantes de marcadores co-dominantes (Nadeem *et al.*, 2018).



**Figura 2.** Amplificação dos genomas de 48 acessos (larvas) de *Tenebrio molitor*, oriundos de oito municípios brasileiros. As seqüências ordinais superior e inferior referem-se aos oligonucleotídeos ISSR 827 e ISSR 847 (Ta: 47°C), respectivamente. Cada uma das amostras continham 25 uL de mix-PCR, 5 uL de GelRed™ e 3 uL de corante tipo IV, submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v), durante 3 h.

De posse dos resultados das ampliações, foram geradas, pelos coeficientes de dissimilaridade dos índices de "Nei e Li", "Jaccard" e "Coincidência Simples", as matrizes de distâncias genéticas. Na Tabela 4 observam-se comparações entre os índices considerando os acessos mais e menos divergentes, levando em conta as porcentagens relativas. Em contraste com o índice de "Coincidência Simples", os índices de "Nei e Li" e "Jaccard" apresentam a vantagem de não considerarem coincidências do tipo (0)-(0), que, por sua vez, não significam necessariamente alelos recessivos idênticos. Caso haja alta probabilidade de não-amplificação de bandas em pares de acessos; tal situação não deve ser interpretada como uma característica comum, ou seja, não implicam em regiões do DNA idênticas, sendo mais adequado aplicar coeficientes que excluem a co-ocorrência negativa (Ariel *et al.*, 2004). No entanto, não se devem descartar as medidas de similaridade que levam em consideração a concordância negativa, pois em determinados situações, como é caso de populações controladas  $F_2$ , a ausência da marca pode ser tratada como um fator de similaridade entre acesso a serem comparados (Meyer *et al.* 2004). No caso deste estudo, os acessos larvais de *T. molitor* foram obtidos de comércios varejistas de oito municípios brasileiros, o que remete ao caráter de amostragem semelhante ao de populações exôgâmicas obtidas livremente na natureza.

Alguns trabalhos têm comparado a eficiência dos coeficientes de similaridade em expressar o grau de divergência genética (Benin *et al.*, 2003; Filho *et al.*, 2008; Faria *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2013). De modo geral, quase sempre o número de grupos formados altera conforme o índice utilizado, e aqueles que consideram a co-ocorrência negativa (0-0), produzem resultados bastante discrepantes dos demais, o que também foi notado quanto aos apontamentos dos acessos na Tabela 4. Portanto, o índice de "Coincidência Simples" não seria o mais pertinente para estimar a divergência genética neste trabalho. Tem sido consenso a idéia de que, ao se trabalhar com materiais exóticos ou envolvendo espécies diferenciadas, a princípio pouco relacionadas, o adequado seria adotar o índice de "Nei e Li", o qual pondera

em duas vezes os valores de coincidências do tipo (1)-(1) para cada par de acessos (Mir et al., 2021). Contudo, se o estudo for feito dentro de uma população, ou mesmo, espécie, em que coincidências de ocorrência de bandas podem ser admitidas como um fenômeno esperado, seria plausível optar pelo índice de Jaccard. Neste estudo de diversidade envolvendo *T. molitor*, todas as análises subseqüentes embasaram-se no índice de "Nei e Li".

**Tabela 4.** Comparações sobre os acessos mais e menos divergentes considerando 131 fragmentos (locos) amplificados em 48 acessos de *Tenebrio molitor*, a partir de 34 oligonucleotídeos ISSR desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada).

Comparações	Índices de dissimilaridade		
	Nei e Li	Jaccard	Coincidência Simples
Mais dissimilares	Acessos 1 e 37 (65,45%)	Acessos 1 e 37 (79,12%)	Acessos 1 e 30 (58,01%)
Menos dissimilares	Acessos 26 e 28 (11,24%)	Acessos 26 e 28 (20,24%)	Acessos 26 e 28 (15,27%)

Na matriz de dissimilaridade gerada pelo complemento aritmético do índice de "Nei e Li" (Tabela 5), observam-se elevados valores de dissimilaridade entre os 48 acessos de *T. molitor*. Considerando as divergências entre pares de acessos, 79 apresentaram valores superiores a 50% (Tabela 5). A diferenciação genética observada neste trabalho é bastante superior à maioria dos estudos de diversidade, sejam eles envolvendo animais, plantas e microorganismos; executados com a mesma coleção de oligonucleotídeos da University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada) (Souza *et al.*, 2008; George *et al.*, 2009; Anand *et al.*, 2010; Rizkalla, *et al.*, 2012; Ghazalli *et al.*, 2015; Vieira *et al.*; 2015). Considerando a ploidia da espécie *T. molitor* ( $2n = 20$ ), a qual possui nº básico é  $X = 10$  (Plohl, 2010), tem-se uma média de 13,1 locos amostrados por cromossomo, levando em conta os 131 fragmentos utilizados na geração da matriz.

**Tabela 5.** Matriz de dissimilaridade (%) (complemento aritmético do índice de "Nei e Li") entre 48 acessos de *Tenebrio molitor*, estimadas a partir de 131 fragmentos (locos), a partir de 34 oligonucleotídeos ISSR desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada).

Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
1	0																									
2	48	0																								
3	49	18	0																							
4	52	22	20	0																						
5	53	14	17	20	0																					
6	43	19	20	20	15	0																				
7	55	21	20	22	15	17	0																			
8	59	21	25	23	19	24	15	0																		
9	58	25	30	26	24	26	27	20	0																	
10	51	32	32	27	32	27	28	26	31	0																
11	59	24	24	26	23	25	18	19	28	36	0															
12	60	27	33	25	25	27	30	27	25	35	27	0														
13	51	29	31	29	32	27	31	32	40	28	33	31	0													
14	50	25	26	23	21	25	21	23	33	32	32	29	25	0												
15	52	51	48	50	45	45	47	44	48	45	52	42	42	45	0											
16	56	53	47	44	51	46	44	48	50	40	53	53	37	43	40	0										
17	56	32	33	30	32	31	29	27	35	30	33	37	29	26	43	35	0									
18	65	32	31	32	31	34	29	36	40	41	27	36	32	30	56	51	22	0								
19	57	31	31	23	27	28	24	27	31	31	26	30	34	29	54	41	28	27	0							
20	56	31	32	26	35	32	31	29	29	29	32	34	33	30	55	37	26	30	18	0						
21	54	33	31	29	33	28	31	33	38	38	32	36	33	30	58	43	32	32	28	20	0					
22	56	26	29	27	32	29	26	31	40	33	30	35	29	33	51	48	38	34	35	31	20	0				
23	52	32	28	24	29	30	30	31	37	33	37	36	33	25	44	46	39	40	33	32	33	30	0			
24	52	29	33	31	30	32	31	29	38	36	33	34	31	34	38	41	37	39	40	41	39	30	28	0		
25	54	32	28	26	27	30	20	21	28	28	28	34	32	26	51	45	36	37	31	34	38	35	30	33		
26	54	23	23	21	20	23	17	22	25	30	24	32	34	21	53	49	31	27	28	33	30	30	31	35		
27	55	22	26	23	23	23	19	20	26	31	26	29	36	25	51	48	35	36	29	34	33	30	29	31		
28	53	24	23	22	23	29	23	26	28	31	30	34	38	24	48	47	32	29	26	31	34	37	30	35		
29	61	29	30	30	29	28	25	27	32	30	34	38	35	30	52	44	37	34	33	39	33	34	37	36		
30	58	32	32	30	30	32	30	28	30	30	34	29	36	33	48	52	41	41	35	39	39	33	32	39		
31	58	27	27	23	24	25	27	25	27	31	29	31	35	29	49	49	35	35	35	36	35	32	33	39		
32	56	31	32	28	26	25	25	23	27	28	34	31	35	25	47	51	36	37	34	38	35	31	30	36		
33	64	33	30	23	30	32	30	26	25	30	33	32	37	27	53	49	33	35	31	31	35	37	31	36		
34	59	32	33	25	27	28	30	28	27	38	32	30	41	31	53	50	38	37	34	41	41	39	40	40		
35	59	37	34	27	32	31	30	26	27	32	30	32	34	28	48	48	35	33	34	32	34	36	33	38		
36	64	32	32	28	27	29	24	22	32	31	28	41	32	29	48	47	30	32	30	34	36	36	35	35		
37	65	33	40	34	28	35	28	25	34	35	32	30	31	31	44	47	35	38	36	37	36	37	35	34		
38	58	29	32	31	32	33	31	25	32	29	34	35	27	32	42	46	31	32	32	35	36	29	36	30		
39	55	34	37	30	33	32	29	26	32	31	35	32	34	28	39	47	28	36	31	32	34	36	37	35		
40	58	31	41	32	30	36	32	32	41	34	41	36	38	29	53	53	36	38	32	32	40	33	35	34		
41	54	44	47	41	48	40	47	44	47	39	40	46	43	41	59	49	46	45	40	40	42	50	51	45		
42	55	40	42	39	43	37	42	37	40	39	38	47	38	38	56	42	40	43	36	34	40	45	48	48		
43	51	34	38	29	34	34	36	33	33	37	37	36	29	31	47	45	34	35	30	32	36	40	38	38		
44	53	36	40	34	37	38	38	35	38	36	39	41	32	31	49	51	41	41	39	31	37	40	33	38		
45	53	45	52	47	53	46	50	48	49	44	50	51	36	43	54	47	50	49	49	40	44	41	42	39		
46	50	30	33	30	32	27	30	34	39	41	31	37	30	28	52	50	37	32	36	37	30	35	30	35		
47	54	27	32	26	30	30	27	28	36	39	27	30	30	31	47	48	30	32	29	32	30	33	32	33		
48	60	35	40	33	34	34	28	31	39	34	34	39	32	32	51	42	36	38	30	33	37	37	37	43		

Números grifados referem-se a combinações (pares) de acessos mais divergentes entre si (menos similares).

**Tabela 5.** Continuação.

Nº	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	
25	0																								
26	17	0																							
27	18	16	0																						
28	21	11	19	0																					
29	25	20	21	18	0																				
30	26	21	24	19	24	0																			
31	29	20	22	22	22	17	0																		
32	23	17	20	23	23	20	21	0																	
33	25	20	23	19	26	21	21	19	0																
34	31	22	28	25	30	30	15	25	25	0															
35	22	22	25	27	27	26	27	20	20	30	0														
36	28	24	27	27	21	29	24	18	25	29	20	0													
37	31	30	29	29	24	29	29	28	32	32	27	24	0												
38	30	28	29	25	23	23	30	24	26	36	26	23	21	0											
39	28	29	28	26	30	31	28	32	28	30	26	29	26	22	0										
40	34	36	33	33	37	37	34	30	31	36	33	31	29	23	26	0									
41	42	43	42	41	41	48	49	43	40	47	37	42	41	35	39	37	0								
42	37	37	36	35	36	42	37	38	33	36	35	37	39	40	37	40	23	0							
43	32	28	31	29	35	33	31	29	32	33	27	31	35	28	27	34	27	22	0						
44	38	31	34	31	39	37	37	31	31	44	29	35	39	33	32	31	32	32	20	0					
45	48	48	45	45	46	43	47	43	44	49	45	47	41	38	47	44	36	36	36	33	0				
46	32	29	24	33	32	36	27	27	35	34	28	29	34	32	36	36	39	38	25	29	41	0			
47	34	27	27	32	34	35	34	32	36	36	33	32	36	33	36	40	40	37	28	34	44	22	0		
48	33	28	33	29	30	34	34	32	31	38	30	28	33	33	37	37	40	30	31	34	42	29	23	0	

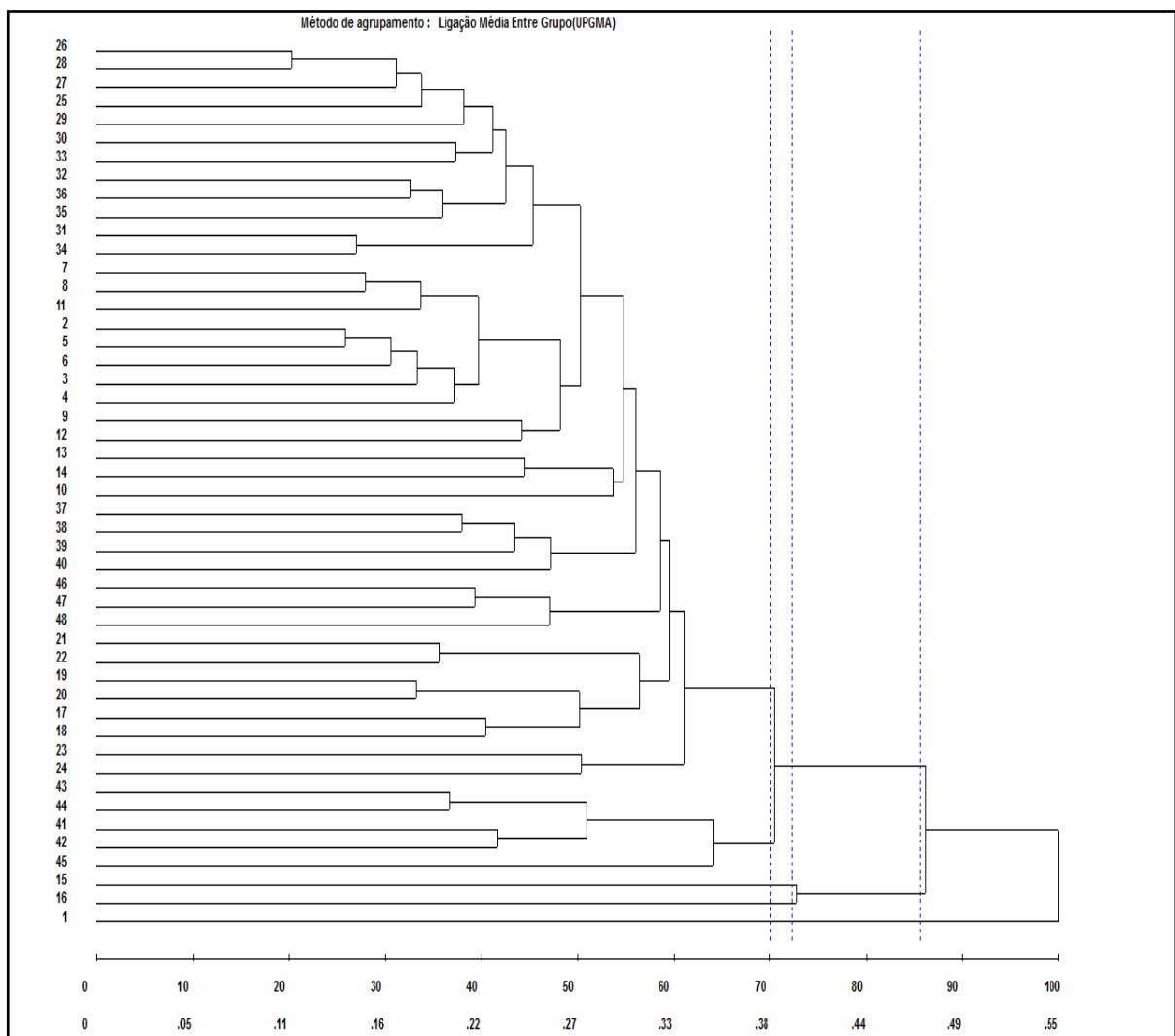
\*Combinações de variedades mais divergentes entre si (menos similares).

Através da análise de agrupamento pelo método "Hierárquico" (UPGMA) foi obtido um dendrograma (Figura 3), estimado com três cortes nas distâncias de 70,45% (0,3902), 72,68% (0,4023) e 86,19% (0,4770), de modo a formarem-se cinco grupos de acessos (Tabela 6). O número de grupos nos métodos hierárquicos pode ser definido por alguns critérios, tais como razões práticas do pesquisador, análise visual das ramificações do dendrograma, pontos onde há mudança abrupta da ramificação e critérios estatísticos (Cruz et al., 2011). Neste estudo adotou-se o método de Mojena (1977), o qual baseia-se no tamanho relativo dos níveis de fusões (distâncias) no dendrograma.

A discrepância quanto ao número de acessos em cada grupo deveu-se a existência de alguns com grande divergência em relação à maioria dos demais, embora, de modo geral, a dissimilaridade tenha sido bastante elevada, mesmo dentro do grupo I que reuniu 40 deles (Tabela 6). Contudo, essas informações podem ser úteis quando há o interesse na realização

de hibridações que explorem o máximo de efeitos heteróticos (Falconer, 1987; Cruz, 2005). Neste caso, o acesso 1, por exemplo, apresentou as maiores dissimilaridades com relação aos demais acessos analisados, seguido pelos acessos 15, 16 e 45 (Tabelas 5 e 6; Figura 3).

Nos métodos hierárquicos, os indivíduos são agrupados por um processo que se repete em vários níveis, até que seja estabelecido um dendrograma ou um diagrama arborescente. O UPGMA é um método de agrupamento não-ponderado, que utiliza médias aritméticas das medidas de dissimilaridade, evitando caracterizar a dissimilaridade por valores extremos (máximo e mínimo) entre os genótipos considerados (Tikendra *et al.* 2019).



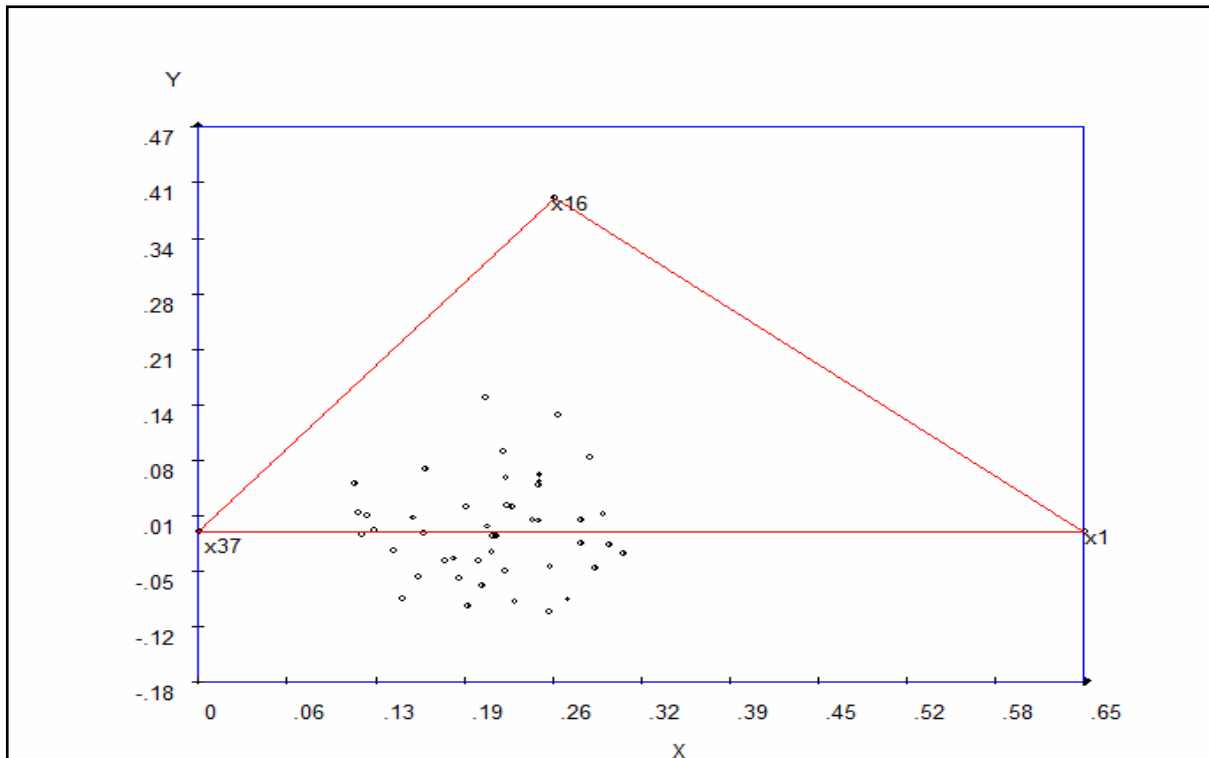
**Figura 3.** Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, com base na matriz de dissimilaridade do índice de Nei e Li, gerada por dados binários de fragmentos ISSR amplificados em 48 acessos de *Tenebrio molitor*.

**Tabela 6.** Agrupamento de 48 acessos de *T. molitor* pelo método Hierárquico (UPGMA) (matriz obtida do índice de Nei e Li), com base em 131 fragmentos amplificados por oligonucleotídeos ISSR - University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada).

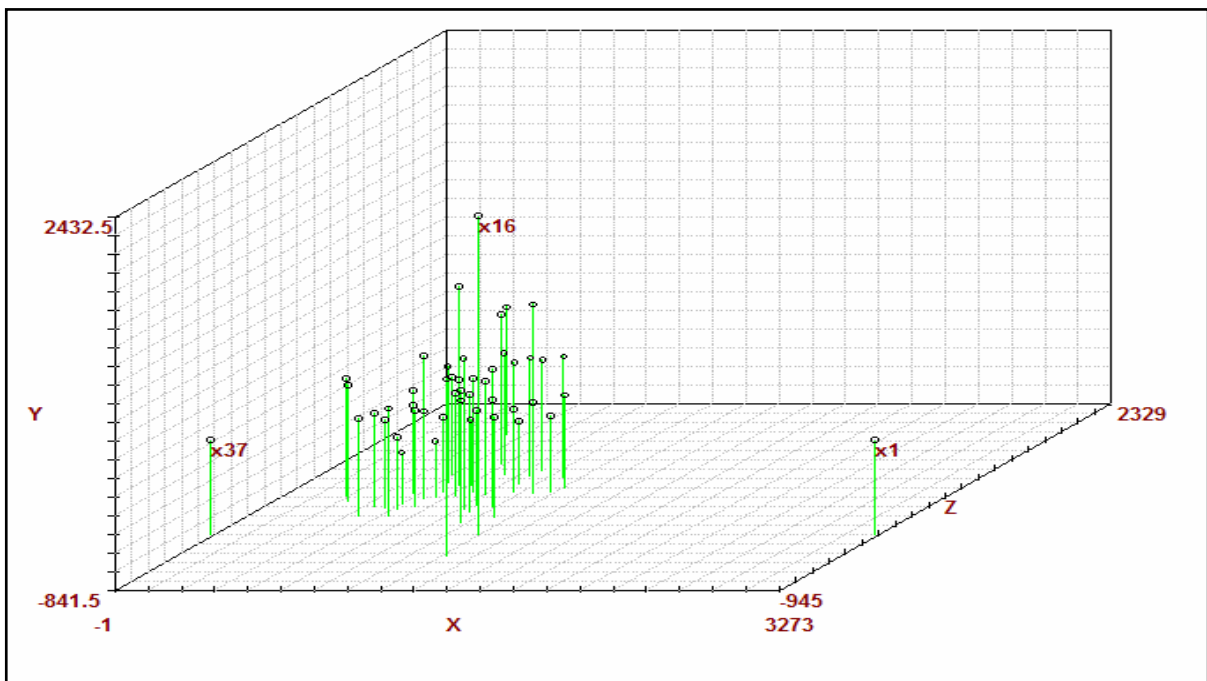
<b>Grupos</b>	<b>Acessos</b>
I	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 46, 47 e 48
II	41, 42, 43, 44 e 45
III	15
IV	16
V	1

Não obstante, a adequação dos resultados deve ser realizada por meio do Coeficiente de Correlação Cofenético (CCC) proposto por Sokal e Rohlf (1962). O CCC é um coeficiente momento-produto calculado entre os elementos da matriz de similaridade ou dissimilaridade e os elementos da matriz cofenética, que quantifica a concordância entre os valores originais e os valores apresentados no dendrograma. Quanto maior o valor do CCC, menor será a distorção provocada ao agrupar os genótipos, refletindo em representações gráficas de baixas distorções (Manly, 2008). Valores acima de 0,7 são considerados pertinentes à representação gráfica, sendo que, no presente estudo obteve-se um CCC foi de 0,8733. Nas Figuras 4 e 5 observam-se projeções em 2D (duas dimensões) e 3D (três dimensões), respectivamente. Observa-se, em destaque, a triangulação envolvendo os acessos "1 (x1)", "16 (x16)" e "37 (x37)", caracterizados como os pontos de máxima diversidade mútua (Figura 4), o que é também corroborado na versão 3D (Figura 5).

O agrupamento pelo método de "Tocher" é normalmente utilizado juntamente com o "Hierárquico" (UPGMA), que, geralmente, revelam boa correspondência na alocação dos elementos nos grupos (Arriel *et al.* 2006). No presente estudo ocorreram diferenças nos agrupamentos envolvendo os dois métodos, observando-se quatro grupos para o Tocher (Tabela 7). De modo geral, os acessos 1, 15, 16 e 45 coincidem nos destacamentos que ocorreram no agrupamento pelo método Hierárquico (UPGMA).



**Figura 4.** Projeção em 2D (duas dimensões) produzidas pelo grupamento de 48 acessos de *T. molitor* no método Hierárquico (UPGMA) (matriz obtida do índice de Nei e Li), com base em 131 fragmentos amplificados por oligonucleotídeos ISSR - University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada).



**Figura 5.** Projeção em 3D (três dimensões) produzidas pelo grupamento de 48 acessos de *T. molitor* no método Hierárquico (UPGMA) (matriz obtida do índice de Nei e Li), com base em 131 fragmentos amplificados por oligonucleotídeos ISSR - University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada).



**Tabela 7.** Agrupamento de 48 acessos de *T. molitor* pelo método de Otimização de Tocher (matriz obtida do índice de Nei e Li), com base em 131 fragmentos amplificados por oligonucleotídeos ISSR - University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada).

<b>Grupos</b>	<b>Acessos</b>
I	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 47 e 48
II	15 e 16
III	45
IV	1

Bussab *et al.* (1990) recomendam a aplicação de mais de um método de agrupamento ao conjunto de dados e que o resultado mais concordante seja aceito como o mais adequado. Isso evita que a classificação seja um mero artefato da técnica utilizada, já que cada técnica impõe determinada estrutura aos dados. O método de otimização mais utilizado é o método de Tocher, que usa o critério do estabelecimento de grupos, de forma que a distância média intra-grupos seja sempre inferior a qualquer distância inter-grupos (Rao, 1952). Dessa forma, é possível alcançar uma partição do conjunto de indivíduos em subgrupos mutuamente exclusivos por meio da maximização ou minimização de alguma medida predefinida.

O processo inicial de avaliação da diversidade genética, ora executado neste trabalho, potencializa as chances de identificação de genitores adequados à obtenção de híbridos com maior efeito heterótico e, por conseguinte, maior segregação em recombinações, possibilitando o aparecimento de transgressivos. Estes resultados são de especial interesse para a concepção de um programa de melhoramento de matrizes para produção de insetos.

## **Conflito de interesses**

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

## **AGRADECIMENTOS**

Esta pesquisa foi financiada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, "Biofábrica: Fortalecimentos da Agricultura Familiar e Meio Ambiente no Norte de Minas Gerais – Fase I" 2017 - 2021, concebido por um Termo de Execução Descentralizada - TED entre a Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (Governo Federal - Brasil), Processo 55000.003361/2016-75), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo #433089/2016-4), Convênio BNB/FUNDECI (processo #2017.0012 e processo #2017.0018), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Agradecemos ao Curso de Mestrado em Alimentos e Saúde da Universidade Federal de Minas Gerais e ao Laboratório de Biotecnologia (ICA/UFMG) pelo uso das instalações.

## REFERÊNCIAS

- ANAND, K. K.; SRIVASTAVA, R. K.; CHAUDHARY, L. B.; SINGH, A. K. Delimitation of species of the *Astragalus rhizanthus* complex (Fabacea) using molecular markers RAPD, ISSR and DAMD. *Taiwania*, v. 55, p. 197-207, 2010.
- ARRIEL, N. H. C.; MAURO, A. O.; CRUZ, C. D.; MAURO, S. M. Z.; COSTA, M. M.; UNEDA-TREVISOLI, S. H.; CAPELOTO, A. Comparison of similarity coefficients in sesame cultivars clustering using RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. v. 4, p. 192-199, 2004.
- ASLAM, M.; RESHI, Z. A.; SIDDIQI, T. O. Genetic divergence in half-sib progenies of *Pinus wallichiana* A. B. Jackson plus trees in the Kashmir Himalaya, India. *Tropical Ecology*, v. 52, p. 201-208, 2011.
- BARBOSA NETO, J. F.; BERED, F. Marcadores moleculares e diversidade genética no melhoramento de plantas. In: MILACH, S. C. K. Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1998. p. 29-40.
- BENIN, G.; CARVALHO; F. I. F.; OLIVEIRA, A. C.; MARCHIORO, V. S.; LORENCETTI, C.; KUREK, A. J.; SILVA, J. A. G.; CRUZ, P. J.; HARTWIG, I.; SCHMIDT, D. A. M. Comparações entre medidas de dissimilaridade e estatísticas multivariadas como critérios no direcionamento de hibridações em aveia dissimilaridade e estatísticas multivariadas como critérios no direcionamento. *Ciência Rural*, v. 33, p. 657-662, 2003.
- BEREZINA, N., HUBERT, A., BERRO, F., LEVON, J. G., LE ROUX, K., SOCOLSKY, C.; LAURENT, S. (2018). U.S. Patent Application nº 15/541,186.
- BERTAN, I.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C.; VIEIRA, E. A.; HARTWING, I.; SILVA, J. A. G.; SHIMIDT, D. A. M.; VALÉRIO, I. P.; BUSATO, C. C.; RIBEIRO, G. Comparação de métodos de agrupamento na representação da distância morfológica entre genótipos de trigo. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.12, p. 279-286, 2006.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Org.). Marcadores Moleculares. 2. ed. Viçosa: UFV. 2009. 532p.
- BUSSAB, W. O.; MIAZAKI, E. S.; ANDRADE, D. F. Introdução à análise de agrupamento. São Paulo, SP: IME - USP, 1990. 105 p.
- CAVENAGHI, D. F. L. C.; LINS JUNIOR, J. C.; DUARTE, J. M. A.; BARROS, W. M.; JESUS, N. R. Caracterização físico-química e microbiológica de larvas de tenébrio (*Tenebrio molitor* L.) criado para consumo humano. In: Vanessa Bordin Vieira; Natiéli Piovesan. (Org.). Inovação em Ciência e Tecnologia de Alimentos 2. 1ed. Ponta Grossa - PR: Atena Editora, 2019, v. 2, p. 77-84.

- COSTA, D. F. VIEIRA, F. A.; FAJARDO, C. G.; CHAGAS, K. P. T. Diversidade genética e seleção de iniciadores ISSR em uma população natural de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 37, p. 970-976, 2015.
- COSTA, R. B.; SILVA, J. C.; SKOWRONSKI, L.; CONSTANTINO, M.; PISTORI, H.; PINTO, J. V. C. Genetic divergence in *Eucalyptus camaldulensis* progenies in the Savanna Biome in Mato Grosso, Brazil. *PLoS ONE*, v. 11, p. 1-9, 2016.
- COUCH, J. A.; FRITZ, P. J. Isolation of DNA from plants high in polyphenols. *Plant Molecular Biology Reporter*, Tucson, v. 8, p. 8-12, 1990.
- CRUZ, C. D. *Princípios de Genética Quantitativa*. 1 ed. Viçosa, MG: Editora UFV. 2005, 391 p.
- CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.
- CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. *Biometria Aplicada ao Estudo da Diversidade Genética*. 1 ed. Viçosa, MG: Editora UFV. 2011, 620 p.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. 2 ed. Viçosa, MG: Editora UFV. 2001, 390 p.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, p. 13-15, 1990.
- ERTIRO, B. T.; SEMAGN, K.; BISWANATH D. A. S.; OLSEN, M.; LABUSCHAGNE, WORKU, M.; WEGARY, D.; AZMACH, G.; OGUGO, V.; KENO T.; ABEBE, B.; CHIBSA, T.; MENKIR, A. Genetic variation and population structure of maize inbred lines adapted to the mid-altitude sub-humid maize agro-ecology of Ethiopia using single nucleotide polymorphic (SNP) markers. *BMC Genomics*, v.18, p. 1-11, 2017.
- FALCONER, D. S. *Introdução à genética quantitativa*. Viçosa, MG: UFV, 1987. 279 p.
- FALEIRO, F. G. *Marcadores Genético-Moleculares Aplicados aos Programas de Conservação e Uso de Recursos Genéticos*. 1. ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 2007, 102 p.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nation (2015). The contribution of insects to food security, livelihoods and the environment. Roma. Disponível em: <<http://www.fao.org/forestry/edibleinsects/en/>>. Acessado em 21 de dezembro de 2021.
- FARIA, P. N.; CECON, P. R.; SILVA, A. R.; FINGER, F. L.; SILVA, F. F.; CRUZ, C. D.; SÁVIO, F. L. Métodos de agrupamento em estudo de divergência genética de pimentas. *Horticultura Brasileira*, v. 30, p. 428-432, 2012.
- FERREIRA, D. F. *Estatística Multivariada*. 1 ed. Lavras: Editora UFLA, 2008. 662 p.

- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.
- FILHO, A. C.; RIBEIRO, N. D.; REIS, R. C. P.; SOUZA, J. R.; JOST, E. Comparação de métodos de agrupamento para o estudo da divergência genética em cultivares de feijão. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, p. 2138-2145, 2008.
- GEORGE, S.; SHARMA, J.; YADON, V. L. Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. *American Journal of Botany*, New York, v. 96, p. 2022-2030, 2009.
- GHAZALLI, M. N.; YUNUS, M. F.; MOHAMMAD, A. L. Assessment of genetic relationships within *Bouea* (Anacardiaceae) accessions in Peninsular Malaysia using Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, v. 14, p. 76-85, 2015.
- GOLDWIN, I. D.; AITKEN, A. B.; SMITH, L. W. Application of inter simple sequence repeats (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, Malden, v. 18, p. 1524-1528, 1997.
- GRAU, T.; VILCINSKAS, A.; JOOP, G. Sustainable farming of the mealworm *Tenebrio molitor* for the production of food and feed. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 72, p. 9-10, 337-349, 2017.
- LEAL, W. S.; MACNEIL, M. D.; CARVALHO, H. G.; VAZ, R. Z.; CARDOSO, F. F. Direct and maternal breed additive and heterosis effects on growth traits of beef cattle raised in southern Brazil. *Journal of Animal Science*, v. 96, p. 2536-2544, 2018.
- LOPES, J. D. S.; COSTA, M. R. J.; ARRIEL, D. A. A. Genetic diversity of potential mother trees of *Myracrodruon urundeuva* Allemão in a remnant population from Brazilian Cerrado using ISSR. *Advances in Forestry Science*, v. 7, p. 1017-1024, 2020.
- MANLY, B. F. J. Métodos estatísticos multivariados: uma introdução (tradução Sara Ianda Carmona). 3 ed. Porto Alegre: Bookman, 2008. 229 p.
- MEYER, A. S.; GARCIA, A. A. F.; SOUZA, A. P.; SOUZA JÚNIOR, C. L. Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with dominant markers in maize (*Zea mays* L.). *Genetics and Molecular Biology*. v. 27, p. 83-91, 2004.
- MINGOTI, S. A. Métodos de Agrupamentos para Dados Quantitativos e Qualitativos. 1 ed. Belo Horizonte, MG: EST-UFGM, 2013. 66 p.
- MISOF, B.; LIU, S.; MEUSEMANN, K.; , PETERS, R. S.; DONATH, A., MAYER, C. Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Revista Science*, v. 346, p. 763-767, 2014.
- MOJENA, R. Hierarchical grouping method and stopping rules: an evaluation. *Computer Journal*. v. 20, p. 359-363, 1977.

NADEEM, M. A., NAWAZ, M. A.; SHAHID, M. Q.; DOĞAN, Y.; COMERTPAY, G.; YILDIZ, M.; HATIPOĞLU, R.; AHMAD, F.; ALSALEH, A.; LABHANE, N.; ÖZKAN, H.; CHUNG, G.; BALOCH, F. S. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, v. 32, p. 261-285, 2018.

NOWAK, V.; PERSIJN, D.; RITTENSCHOBBER, D.; CHARRONDIERE, U. R. Review of food composition data for edible insects. *Food chemistry*, v. 193, p. 39-46, 2016.

NYBOM H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, v. 13, p. 1143-1155, 2004.

PLOHL, M. Those mysterious sequences of satellite DNAs. *Periodicum Biologorum* v. 112, p. 403-410, 2010.

RAO, R. C. *Advanced statistical methods in biometric research*. New York: John Wiley and Sons, 390p. 1952.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter Simple Sequences Repeats (ISSR) polymorphisms and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128, 9-17, 2002.

REIF, J. C.; HALLAUER, A. R.; MELCHINGER A. E. Heterosis and heterotic patterns in maize. *Maydica*, v. 50, p. 215-223, 2005.

REIF, J. C.; XIA, X. C.; MELCHINGER, A. E.; WARBURTON, M. L.; HOISINGTON, D. A.; BECK, D.; BOHN, M.; FRISCH, M. Genetic diversity determined within and among CIMMYT maize populations of tropical, subtropical, and temperate germplasm by SSR markers. *Crop Science*, v. 44, p. 326-334, 2004.

RIDLEY, M. *Evolução*. 3 ed. Porto Alegre, RS: Artmed. 2006. 634 p.

RIZKALLA, A. A.; ATTIA, S. A. A.; EL-HADY, E. A. A. A.; HANNA, N. S.; NASSEEF, J. E. Genetic diversity based on ISSR and protein markers associated with earliness trait in wheat. *World Applied Sciences Journal*, v. 20, p. 23-33, 2012.

RUTTEN, MARTINE; ACHTERBOSCH, T. J.; DE BOER, I. J.M.; CUARESMA, J. C.; GELEIJNSE, J. M.; HAVLÍK, P.; HECKELEI, T.; INGRAM, J.; LEIP, A.; MARETTE, S.; VAN MEIJL, H.; SOLER, L. G.; SWINNEN, J. VAN'T VEER, P.; VERVOORT, J.; ZIMMERMANN, A.; ZIMMERMANN, K. L.; ZUREK, M. Models and foresight for European sustainable food and nutrition security: The vision of the SUSFANS project. *Agricultural Systems*, v. 163, p. 45-57, 2018.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. R.; MANIATIS, T. E. F. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Labs. New York. 1989, 815 p.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon*, Berlin, v.11, p.30-40, 1962.

- SOSA, D. A. T.; FOGLIANO, V. Potencial of insect-derived ingredients for food applications. In V. D. C. Schields (Ed.), *Insect Physiology and Ecology*, London: InTech. 2017, p. 215-231.
- SOUZA, G. A.; CARVALHO, M. R.; MARTINS, E. R.; GUEDES, R. N.; OLIVEIRA, L. O. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 43, p. 843-849, 2008.
- SOUZA, L. C.; SILVA JUNIOR, A. L.; MIRANDA, F. D.; SOUZA, M. C.; KUNZ, S. H.; PEREIRA, A. G. Validação do marcador molecular ISSR para detecção de diversidade genética em *Plathymenia reticulata* Benth. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v. 13, p. 1-6, 2018.
- TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C. ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. (Org.). *Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações*. 1. ed. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética. 2018. 181 p.
- VAN HUIS, A. VAN ITTERBEECK, J.; KLUNDER H.; MERTENS, E.; HALLORAN, A.; VANTOMME, P. *Edible insects: future prospects for food and feed security*. Number 171. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013. 187 p.
- VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. F.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; FONSECA, K. G.; SILVA. M. S.; PAULA-MORAES, V. S.; CARVALHO, L. J. C. B.. Caracterização fenotípica e molecular de acessos de mandioca de indústria com potencial de adaptação às condições do Cerrado do Brasil Central Semina: *Ciências Agrárias*, Londrina, v. 34, p. 567-582, 2013.
- VIEIRA, F. A.; SOUSA, R. F.; SILVA, R. A. R.; FAJARDO, C. G.; MOLINA, W. F. Diversidade genética de *Copernicia prunifera* com o uso de marcadores moleculares ISSR. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v. 10, p. 525-531, 2015.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, London, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

## 5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um dos maiores desafios da indústria alimentícia diz respeito ao crescimento constante da população mundial e a necessidade de gerar proteínas suficientes para alimentar as nove bilhões de pessoas, previstas para o ano de 2050. A produção de matérias-primas ricas em proteínas está aumentando, mas não será suficiente para atender às necessidades de humanos e da produção animal. Governos, instituições internacionais e cientistas estão cada vez mais focando na utilização de insetos como um novo recurso para ração animal e alimentação humana. Neste contexto, há um destaque especial para a espécie *Tenebrio molitor*, devido à suas inúmeras características vantajosas em aspectos nutricionais, de processamento e manejo. O estudo envolvendo a análise da diversidade genética de *T. molitor* é inédito, sendo que este tipo de abordagem abre caminho para o melhoramento genético, para as associações evolutivas e melhor manejo dos diversos materiais existentes, como é o caso dos insetos. No que tange ao melhoramento, a caracterização da variabilidade existente em populações e a seleção de genitores, são peças decisivas em fases iniciais dos programas, pois um dos principais pilares é a identificação de indivíduos contrastantes que maximizem progênies segregantes e efeitos heteróticos (vigor híbrido). Uma medida de divergência genética que possa ser obtida antes que os cruzamentos sejam efetuados, permitiria ao melhorista concentrar esforços naquelas combinações que apresentem maiores chances de sucesso. Na perspectiva deste trabalho, sintetizam-se as principais conclusões:

(i) Foi validado um protocolo de extração de DNA para a espécie *T. molitor*, plenamente satisfatório quanto a intentos de análises moleculares;

(ii) O teste de gradiente de temperatura de anelamento, executado de forma prévia às investigações na população, foi eficiente na seleção de oligonucleotídeos ISSR amplificáveis e polimórficos para *T. molitor*, além de otimizar recursos e esforços nas tarefas de amplificação populacional;

(iii) A aplicação conjunta das análises biométricas sobre os dados moleculares, levou à constatação de uma elevada variabilidade entre os 48 acessos da população, além de apontar alguns indivíduos superlativamente diferenciados, que seriam boas opções como genitores em um programa de melhoramento, a partir desta coleção estudada.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRIEL, N. H. C.; MAURO, A. O.; CRUZ, C. D.; MAURO, S. M. Z.; COSTA, M. M.; UNEDA-TREVISOLI, S. H.; CAPELOTO, A. Comparison of similarity coefficients in sesame cultivars clustering using RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. v. 4, p. 192-199, 2004.
- BERTAN, I.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C.; VIEIRA, E. A.; HARTWING, I.; SILVA, J. A. G.; SHIMIDT, D. A. M.; VALÉRIO, I. P.; BUSATO, C. C.; RIBEIRO, G. Comparação de métodos de agrupamento na representação da distância morfológica entre genótipos de trigo. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.12, p. 279-286, 2006.
- CRUZ, C. D. Programa GENES - versão Windows. 1 ed. Viçosa, MG: Editora UFV. 2006, 285 p.
- CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. *Biometria Aplicada ao Estudo da Diversidade Genética*. 1 ed. Viçosa, MG: Editora UFV. 2011, 620 p.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, p. 13-15, 1990.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nation (2015). The contribution of insects to food security, livelihoods and the environment. Roma. Disponível em: <<http://www.fao.org/forestry/edibleinsects/en/>>. Acessado em 21 de dezembro de 2021.
- FERREIRA, D. F. *Estatística Multivariada*. 1 ed. Lavras: Editora UFLA, 2008. 662 p.
- JIAO, Y. ; ZAN, L. S.; LIU, Y. F.; WANG, H. B. ; GUO, B. L. A novel polymorphism of the MYPN gene and its association with meat quality traits in *Bos taurus*. *Genet Mol Res*, v. 9, n. 3, p. 1751-1758, 2010.
- LINASSI, R.; BORGHETTI, B. Antropoentomofagia: um estudo sobre a potencialidade dos insetos como alimento no Brasil. In: Eraldo Medeiros Costa-Neto. (Org.). *Antropoentomofagia: insetos na alimentação humana*. 1ed. Feira de Santana - BA: UEFS editora, 2011, v. 1, p. 55-75.
- MINGOTI, S. A. *Métodos de Agrupamentos para Dados Quantitativos e Qualitativos*. 1 ed. Belo Horizonte, MG: EST-UFMG, 2013. 66 p.
- MIR, M. A.; MANSOOR, S. ; SUGAPRIYA, M. ; ALYEMENI, M. N. ; WIJAYA, L. ; AHMAD, P. Deciphering genetic diversity analysis of saffron (*Crocus sativus* L.) using RAPD and ISSR markers. *Saudi journal of biological sciences*, v. 28, n. 2, p. 1308-1317, 2021.
- MOHAMMADI, S. A.; PRASANNA, B. M. Analysis of genetic diversity in crop plants - Salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, v.43, p.1235-1248, 2003.

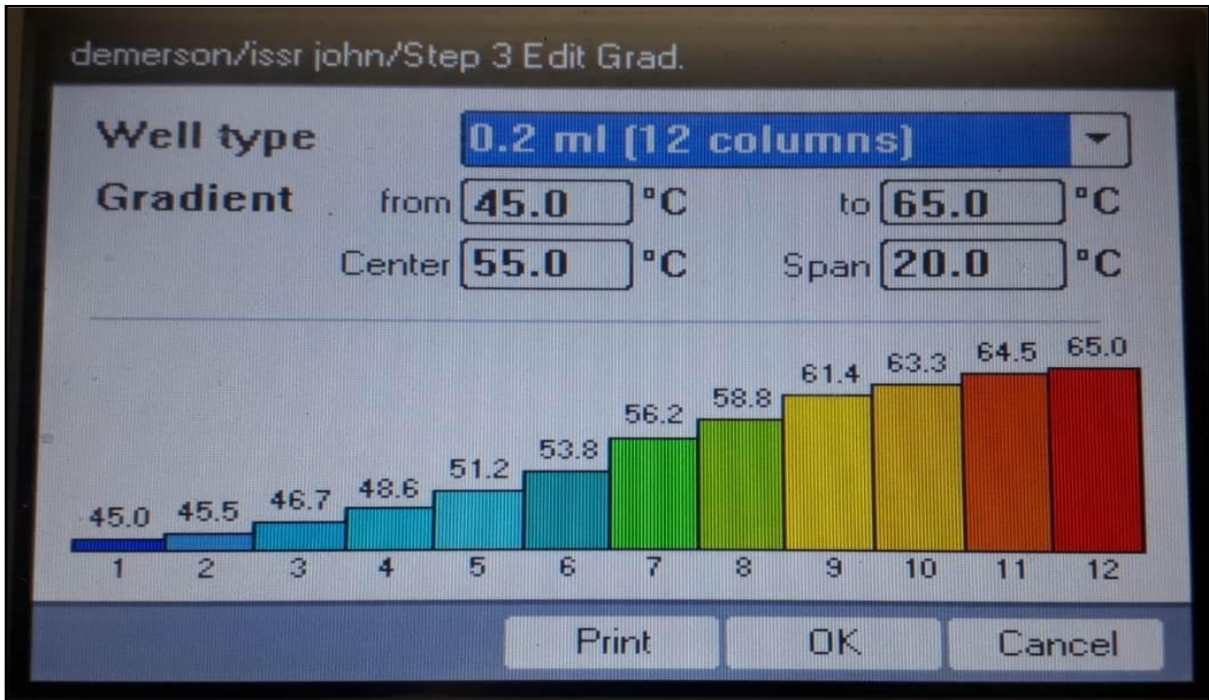
- MOJENA, R. Hierarchical grouping method and stopping rules: an evaluation. *Computer Journal*. v. 20, p. 359-363, 1977.
- RUMPOLD, B. A.; SCHLÜTER, O. K. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition Food Research*. v. 57, p. 802-823, 2013.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. R.; MANIATIS, T. E. F. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Labs. New York. 1989, 815 p.
- SOSA, D. A. T.; FOGLIANO, V. Potential of insect-derived ingredients for food applications. In V. D. C. Shields (Ed.), *Insect Physiology and Ecology*, London: InTech. 2017, p. 215-231.
- TIKENDRA, L.; AMOM, T.; NONGDAM, P. Molecular genetic homogeneity assessment of micropropagated *Dendrobium moschatum* Sw.-A rare medicinal orchid, using RAPD and ISSR markers. *Plant Gene*, v. 19, p. 100196, 2019.
- VAN HUIS, A. Edible insects contributing to food security? *Agriculture & Food Security*, v. 4, p. 1-9, 2015.
- VAN HUIS, A. VAN ITTERBEECK, J.; KLUNDER H.; MERTENS, E.; HALLORAN, A.; VANTOMME, P. Edible insects: future prospects for food and feed security. Number 171. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013. 187 p.
- VASCONCELOS, E. S.; CRUZ, C. D.; BHERING, L. L. FERREIRA, A. Estratégias de amostragem e estabelecimento de coleções nucleares. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, p.507-514, 2007.

## 7. ANEXOS

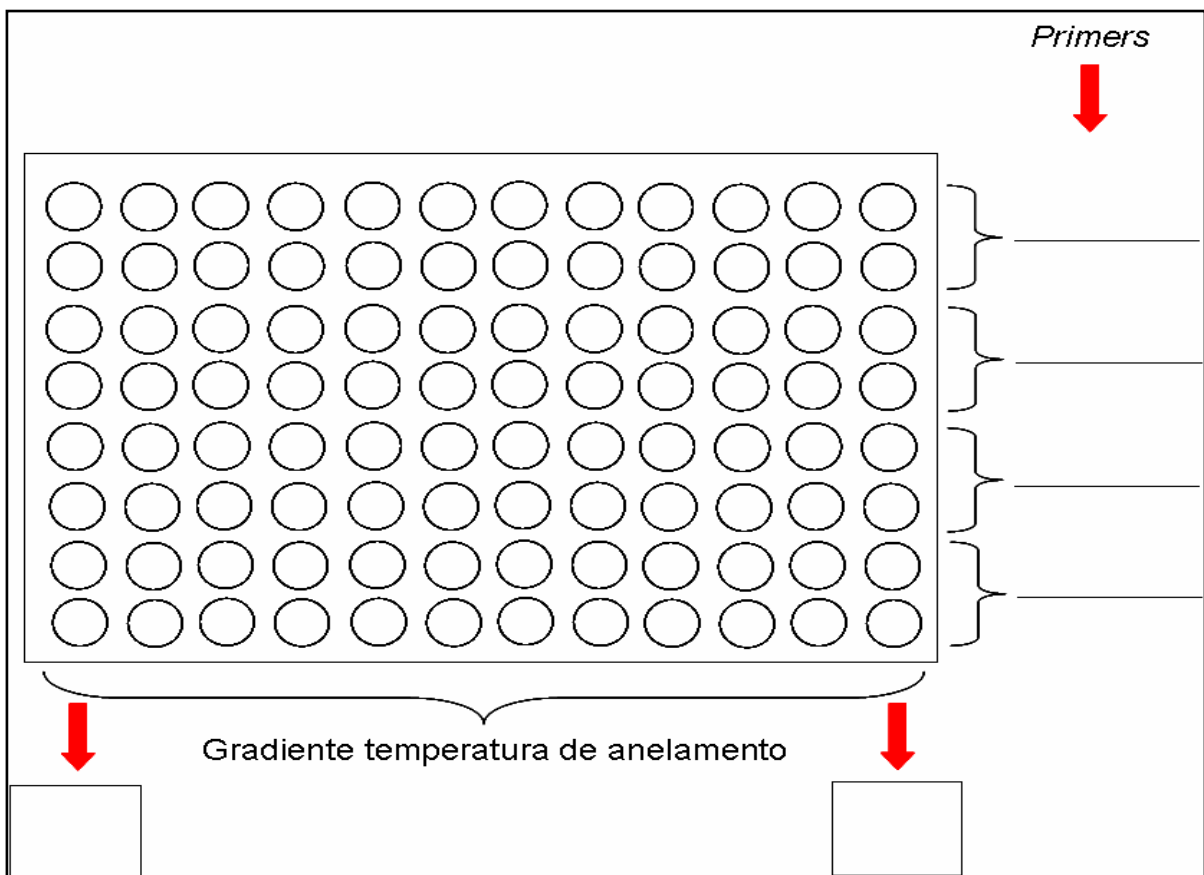
As Figuras (1 a 24) referem-se aos procedimentos moleculares realizados no âmbito do trabalho de Dissertação da acadêmica Ana Carolina Ataíde Silveira (Laboratório de Biotecnologia - CPCA), Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais.



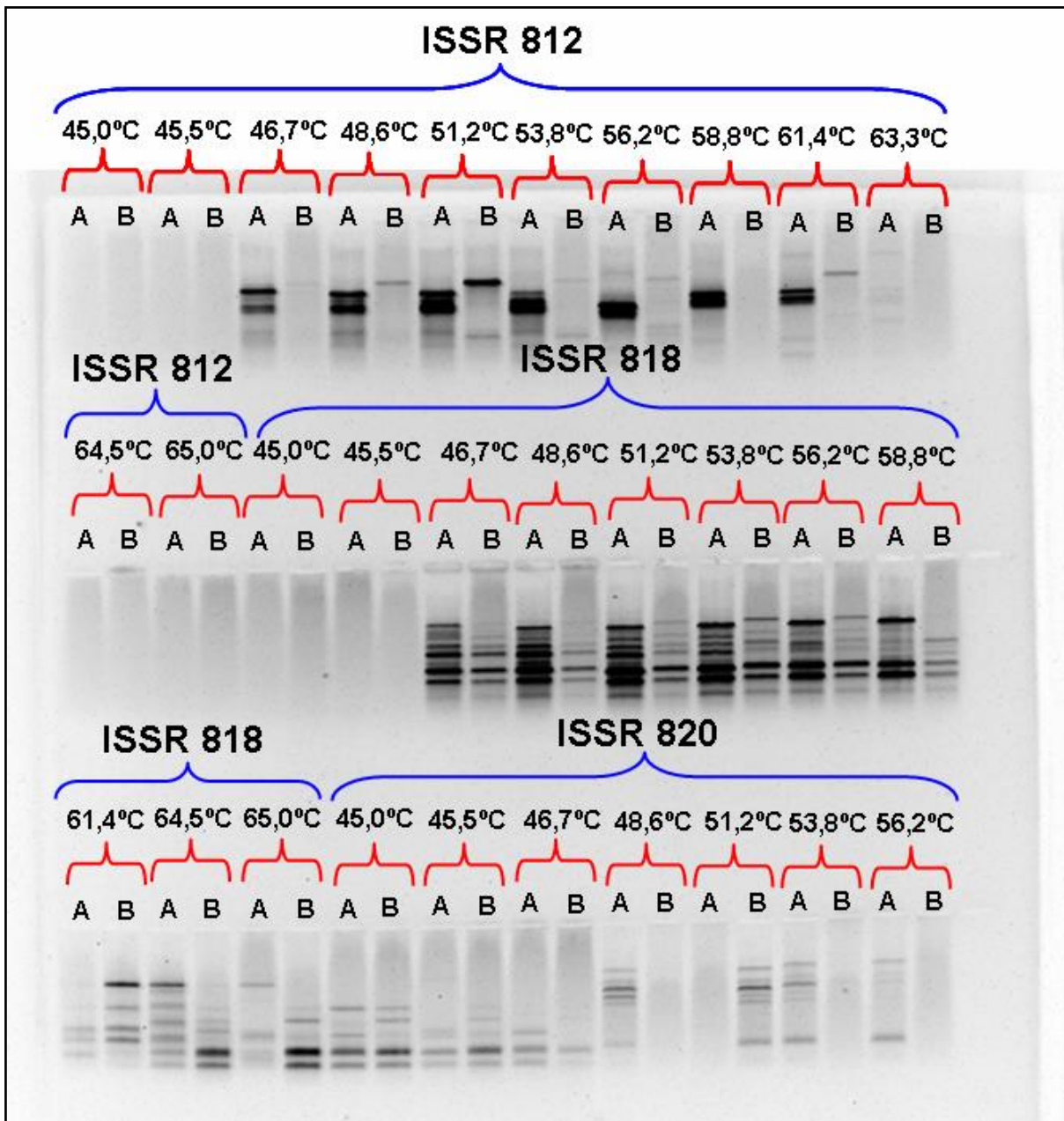
**Figura 1.** Recortes de passos envolvendo a execução do protocolo de extração de DNA de larvas de *Tenebrio molitor*, adaptado de Doyle e Doyle (1990) - Laboratório de Biotecnologia, Centro de Pesquisas em Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, MG, Brasil.



**Figura 2.** Interface fornecida pelo aparelho termociclador (Eppendorf, Nexus Gradient), evidenciando a programação do intervalo em gradiente, quanto às temperaturas de anelamento via PCR (45°C a 65°C).

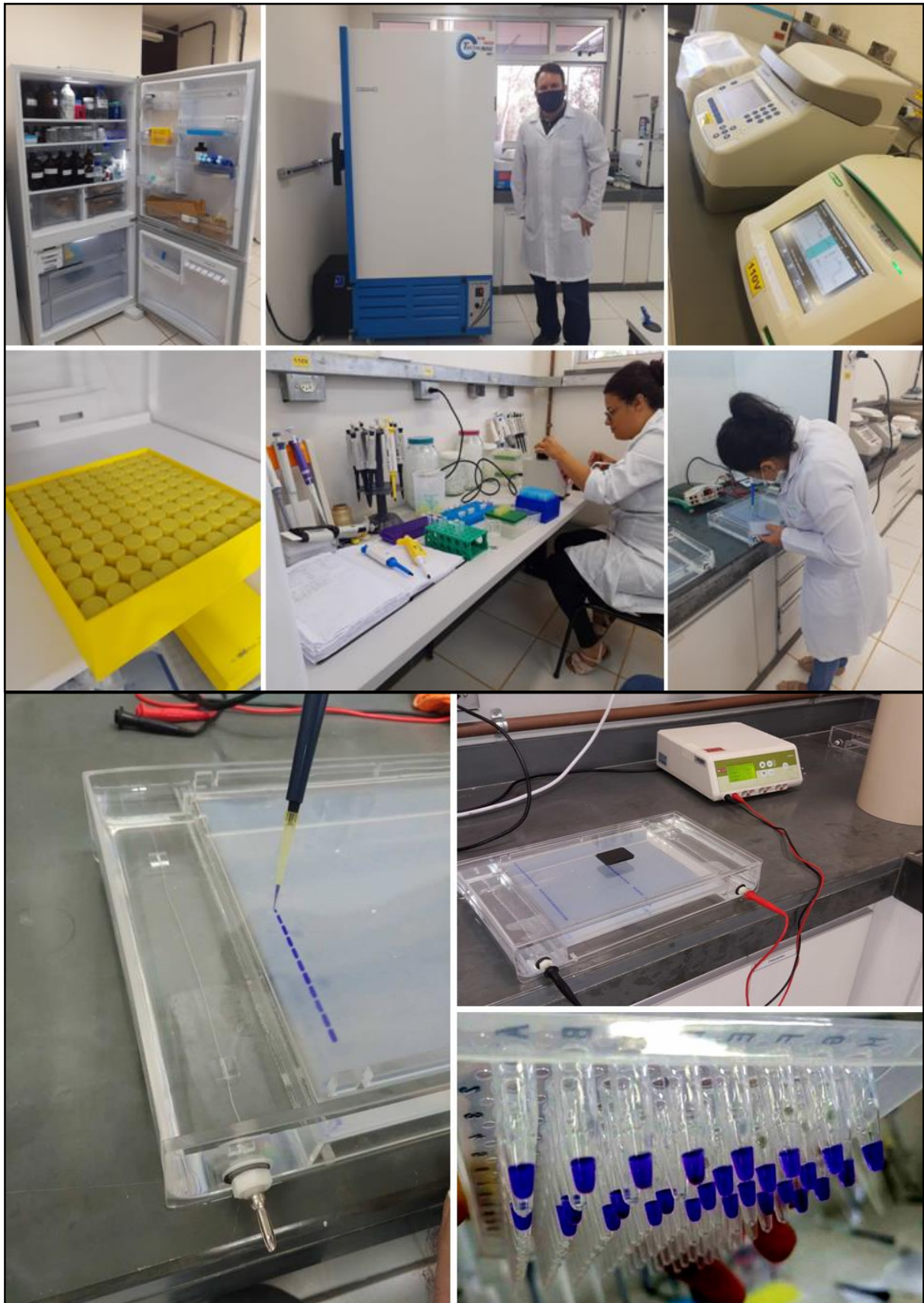


**Figura 3.** Esquema para avaliar o potencial de polimorfismos em reações de PCR, sob gradiente de temperaturas de anelamento.

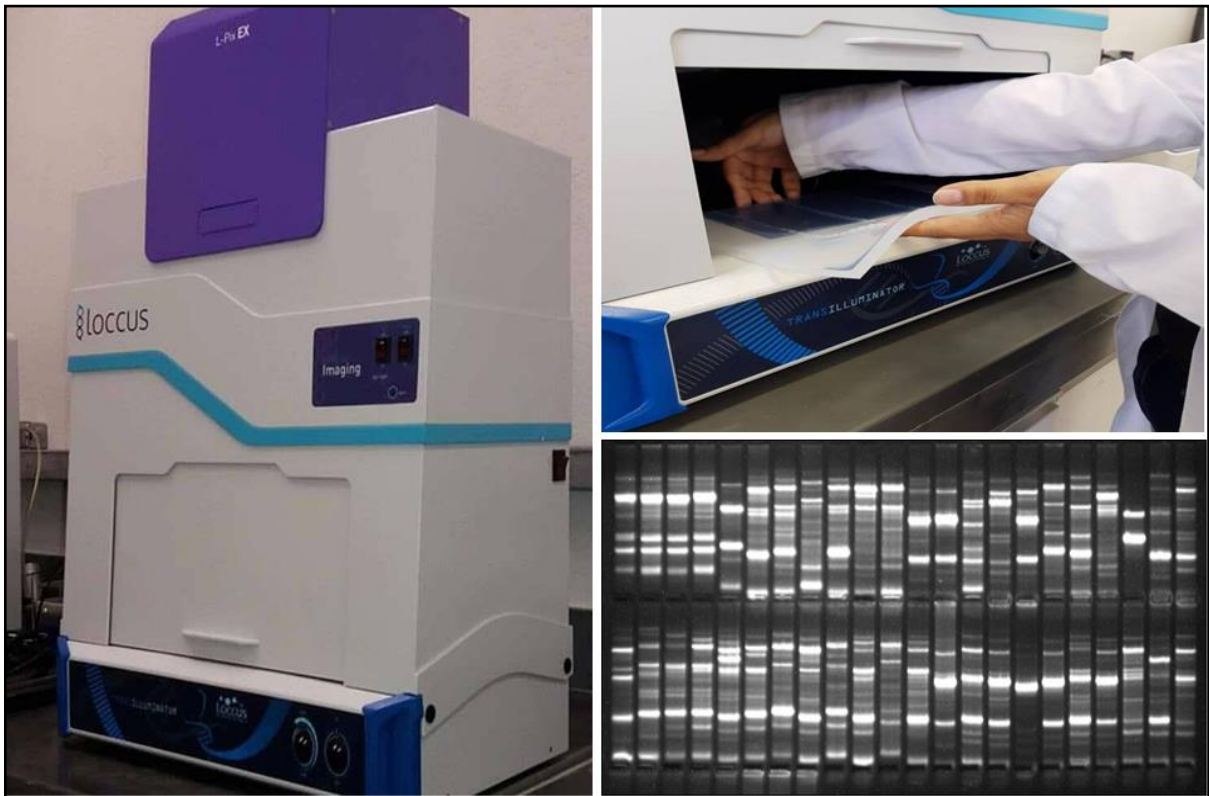


**Figura 4.** Exemplificação de corrida eletroforética para testes de gradiente de temperatura de anelamento, envolvendo oligonucleotídeos ISSR (45°C a 65°C) e DNA de larvas de *Tenebrio molitor*. A e B referem-se a genótipos aleatoriamente escolhidos dos lotes.

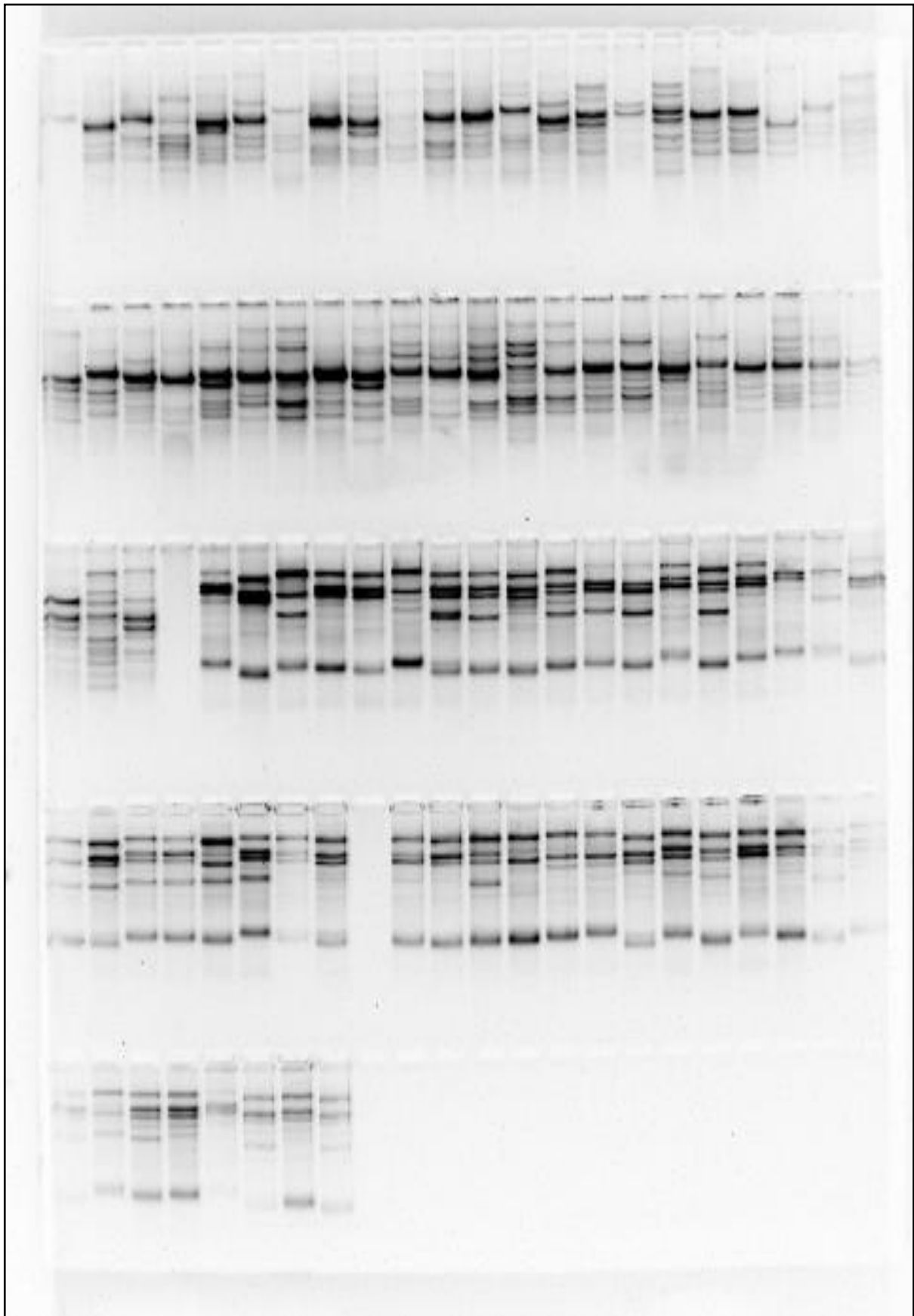




**Figura 5.** Recortes de preparos de reações (reagentes), aparelhos e procedimentos para PCR's e eletroforeses no âmbito da pesquisa de mestrado conduzida pela acadêmica Ana Carolina Ataíde Silveira - Laboratório de Biotecnologia, Centro de Pesquisas em Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, MG, Brasil.

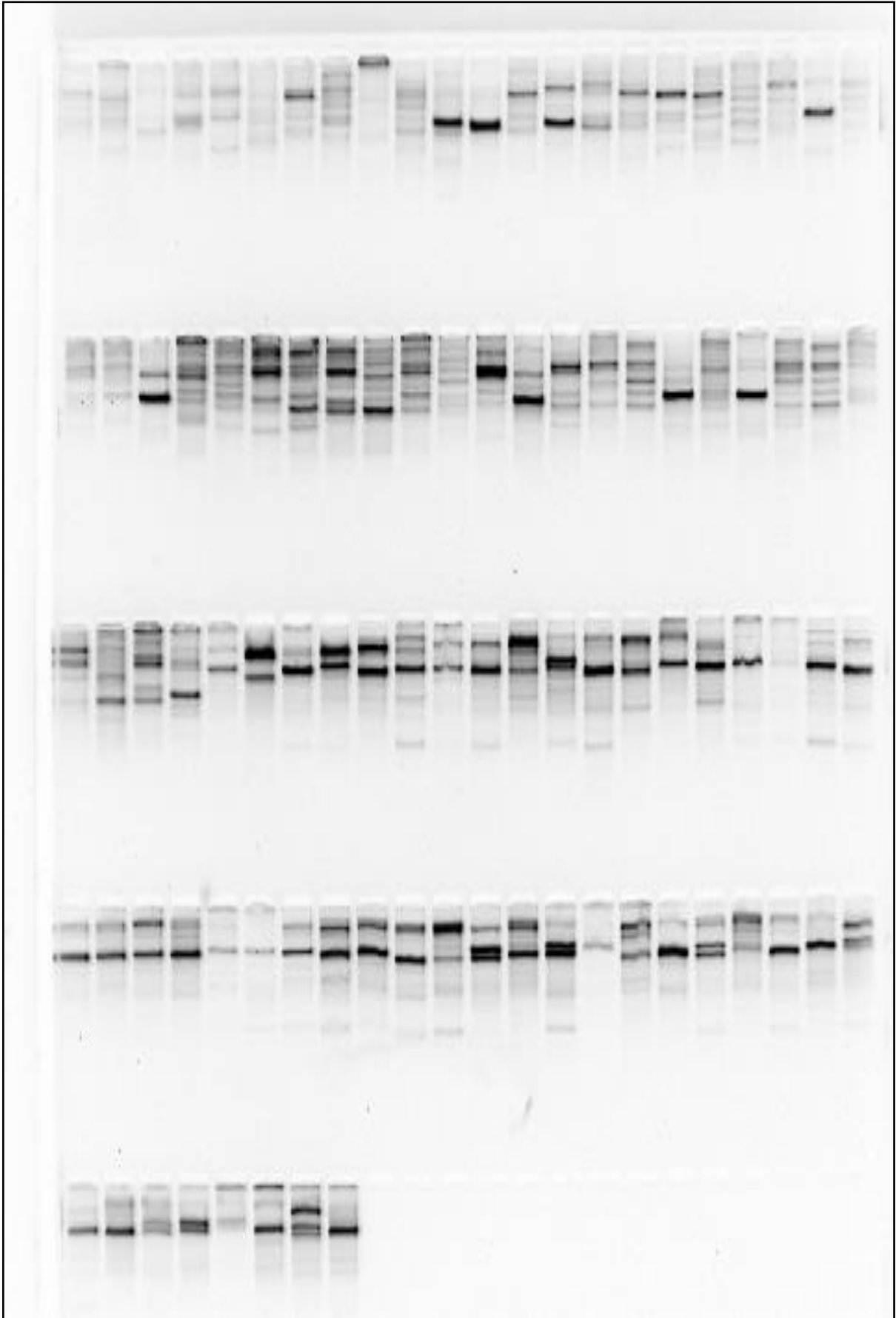


**Figura 6.** Recortes de procedimentos de fotodocumentação no âmbito da pesquisa de mestrado conduzida pela acadêmica Ana Carolina Ataíde Silveira - Laboratório de Biotecnologia, Centro de Pesquisas em Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, MG, Brasil.

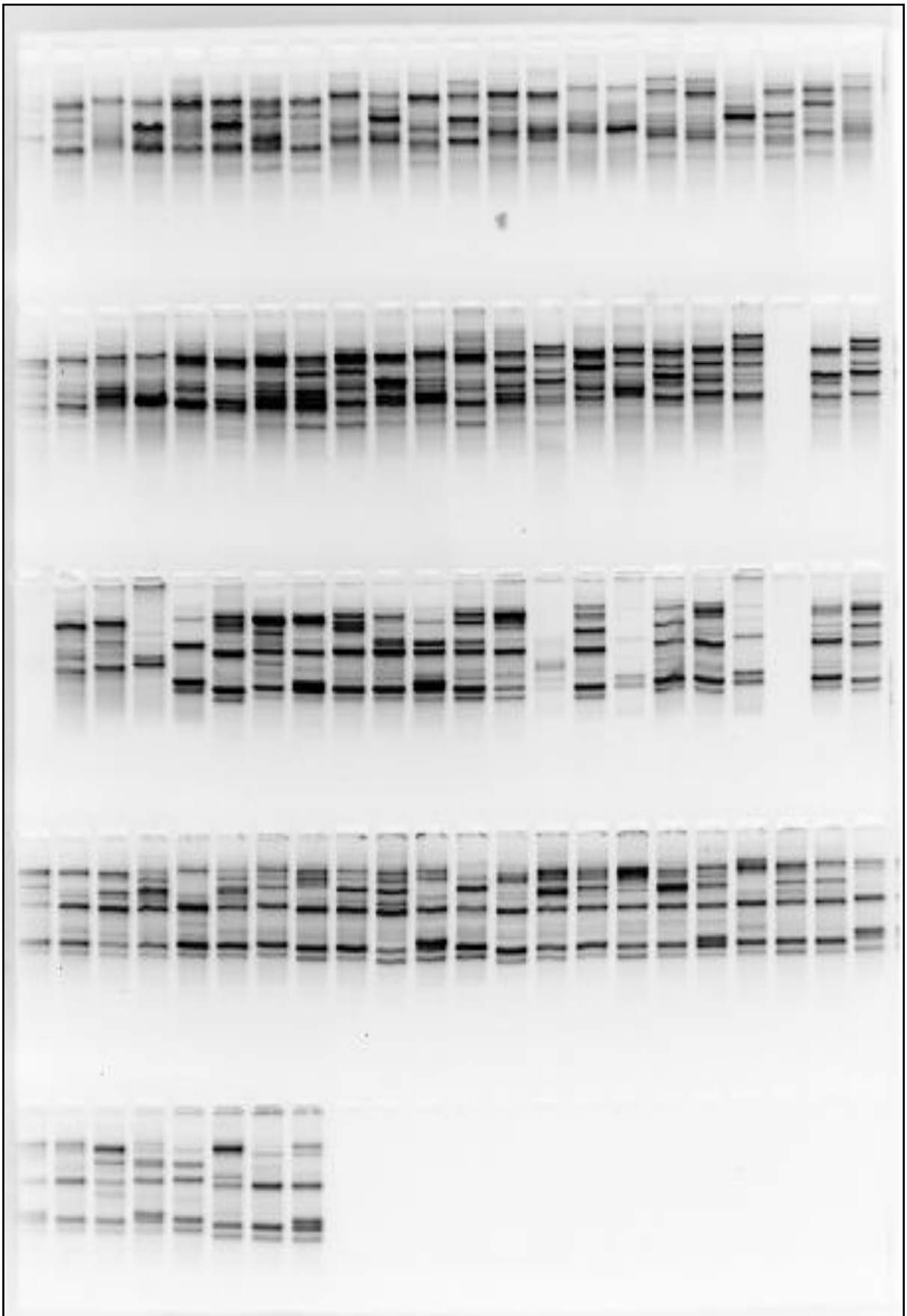


**Figura 7.** Padrão eletroforético a partir das ampliações via PCR dos genomas de 48 acessos de *Tenebrio molitor* - Referência: Placa 1 (Oligonucleotídeos ISSR 816 e 820) Ta: 46°C.

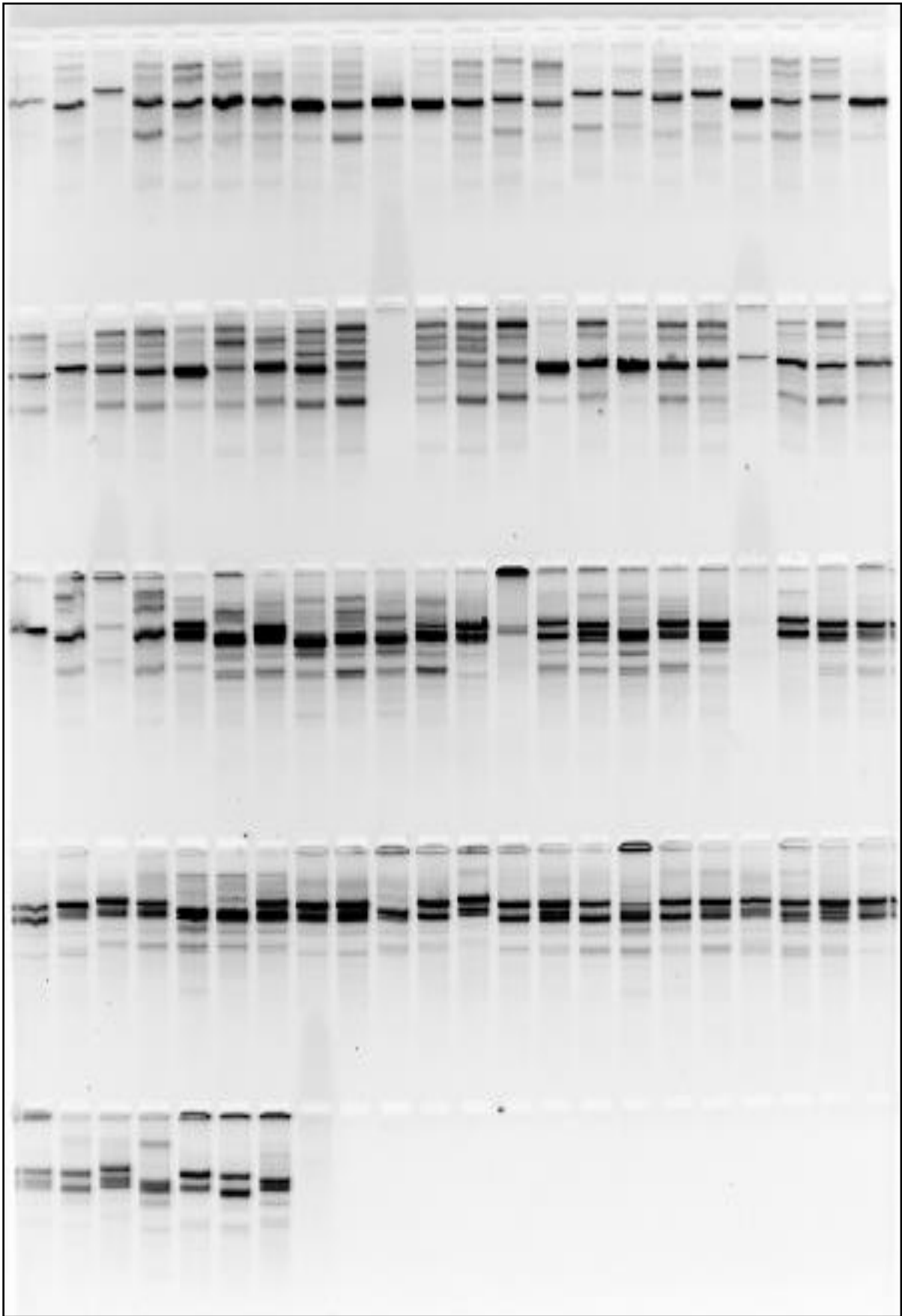




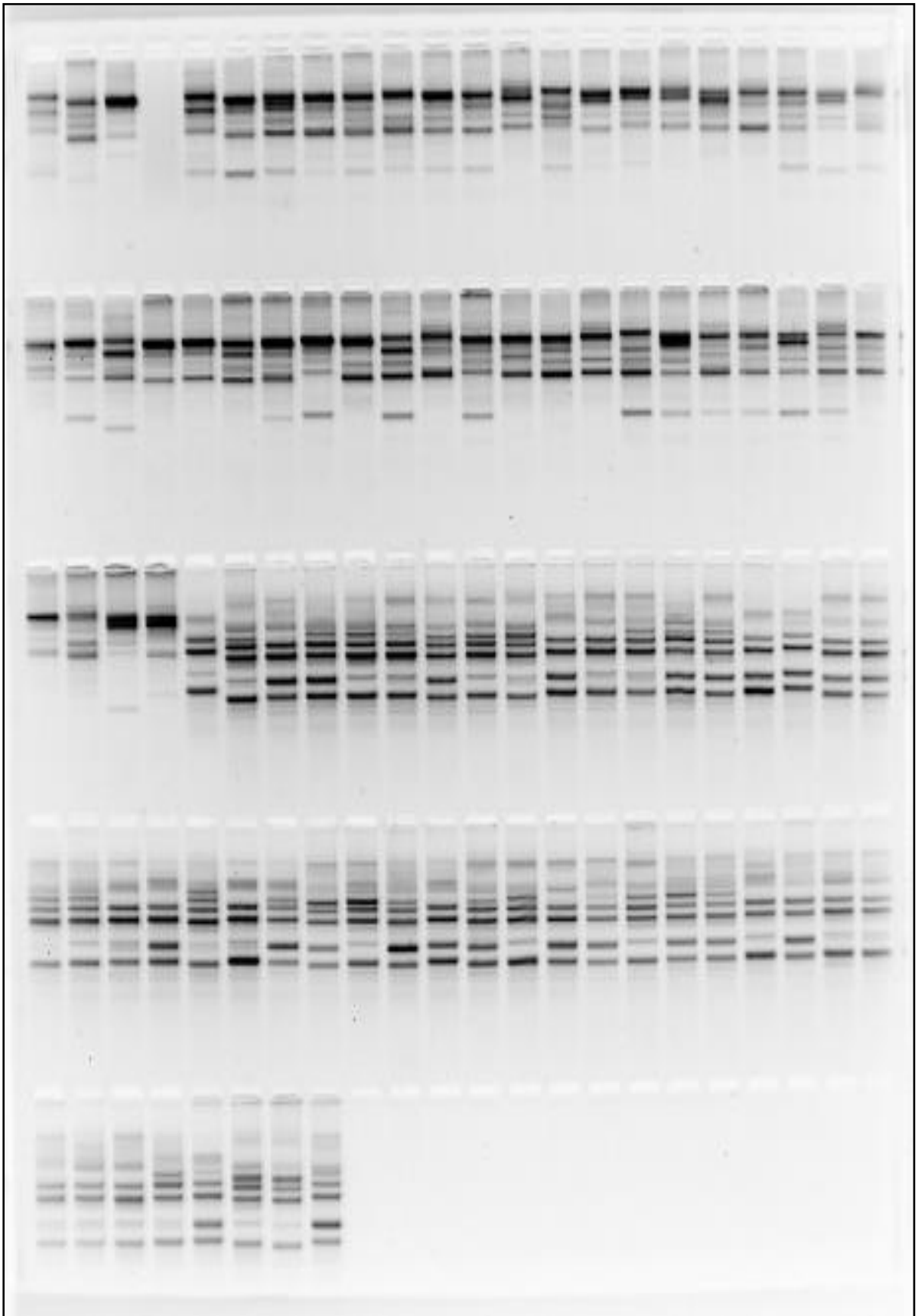
**Figura 8.** Padrão eletroforético a partir das ampliações via PCR dos genomas de 48 acessos de *Tenebrio molitor* - Referência: Placa 2 (Oligonucleotídeos ISSR 823 e 836) Ta: 46°C.



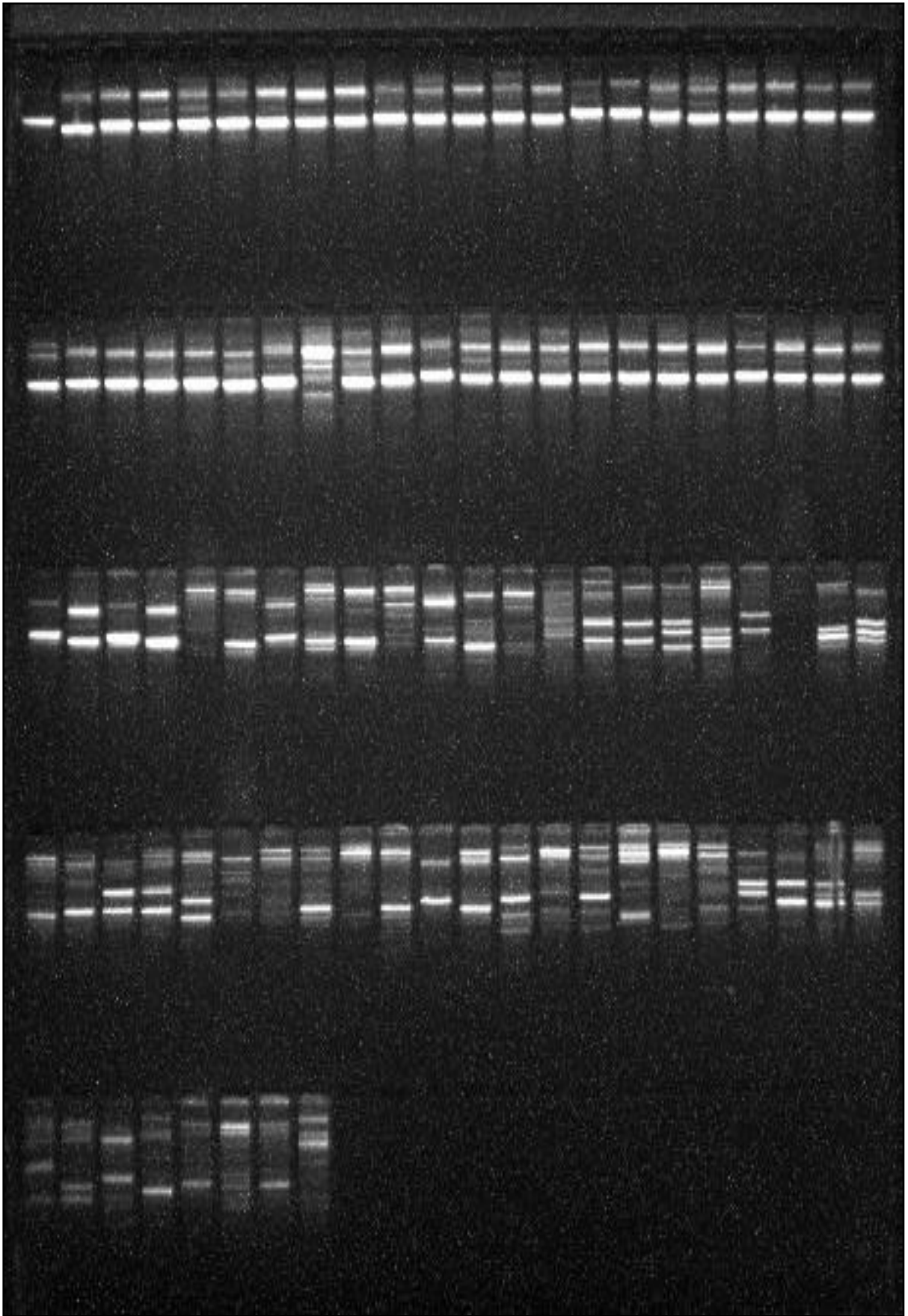
**Figura 9.** Padrão eletroforético a partir das ampliações via PCR dos genomas de 48 acessos de *Tenebrio molitor* - Referência: Placa 3 (Oligonucleotídeos ISSR 850 e 884) Ta: 46°C.



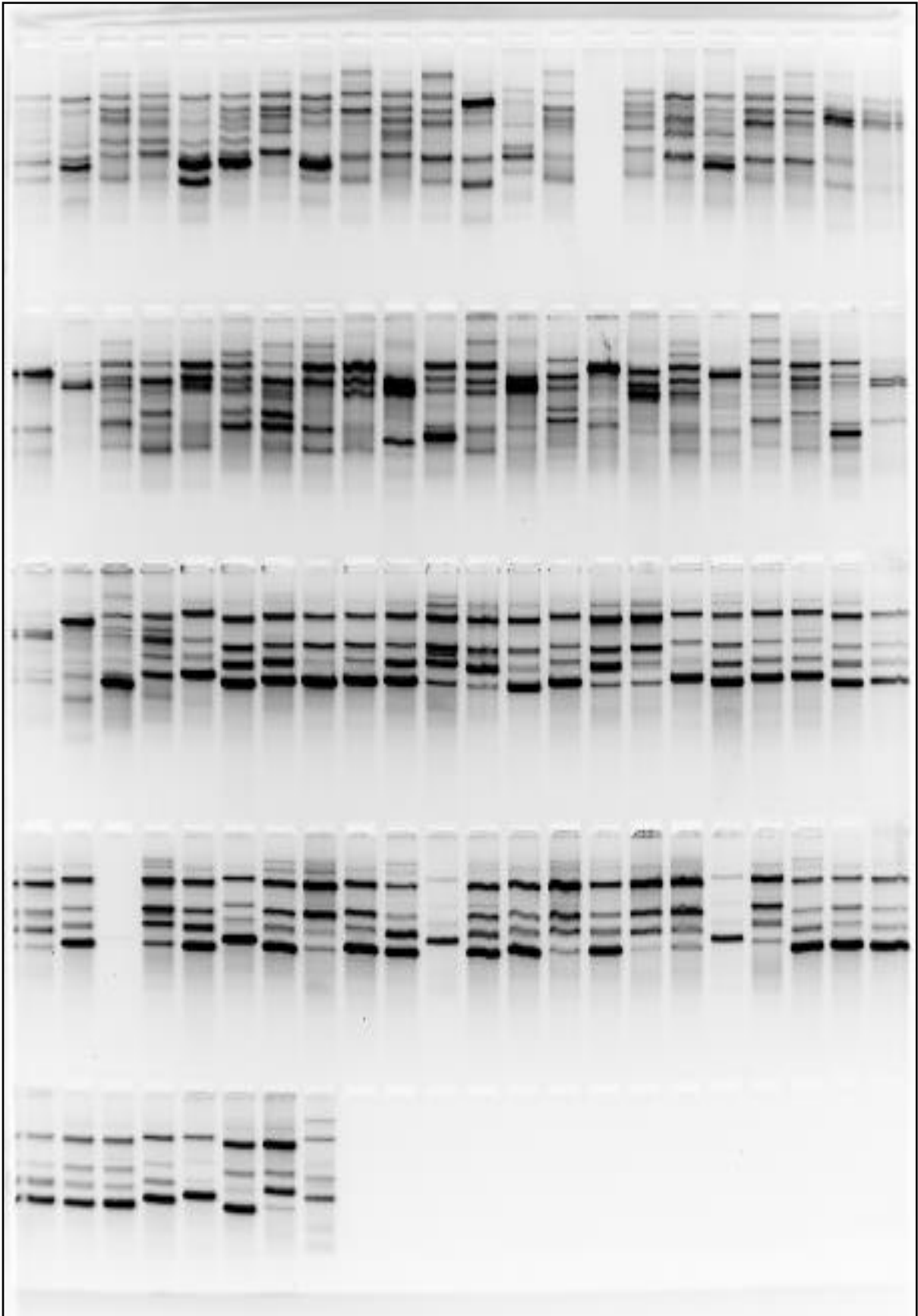
**Figura 10.** Padrão eletroforético a partir das ampliações via PCR dos genomas de 48 acessos de *Tenebrio molitor* - Referência: Placa 4 (Oligonucleotídeos ISSR 828 e 829) Ta: 46°C.



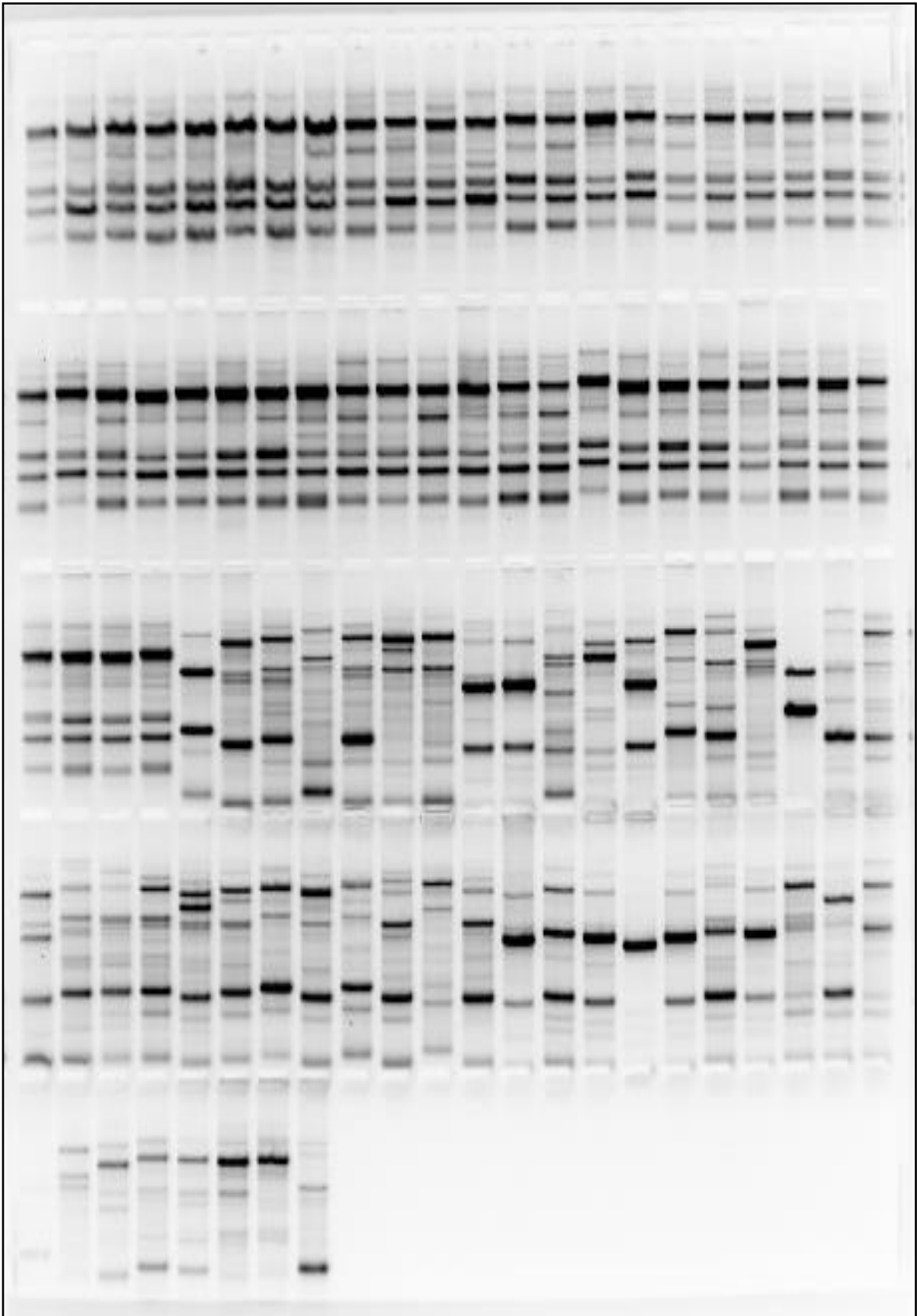
**Figura 11.** Padrão eletroforético a partir das ampliações via PCR dos genomas de 48 acessos de *Tenebrio molitor* - Referência: Placa 5 (Oligonucleotídeos ISSR 880 e 890) Ta: 46°C



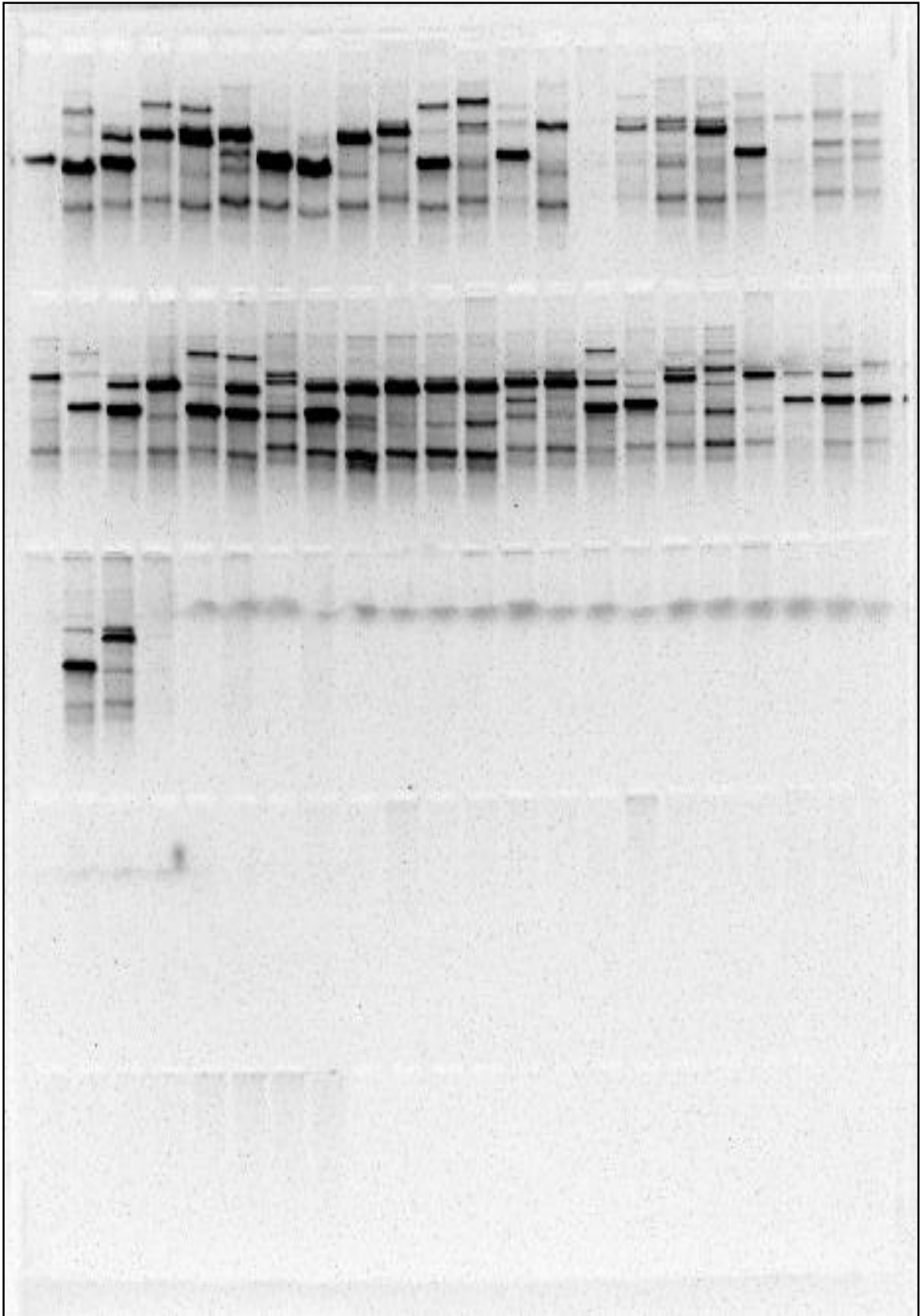
**Figura 12.** Padrão eletroforético a partir das ampliações via PCR dos genomas de 48 acessos de *Tenebrio molitor* - Referência: Placa 6 (Oligonucleotídeos ISSR 808 e 810) Ta: 47°C.



**Figura 13.** Padrão eletroforético a partir das ampliações via PCR dos genomas de 48 acessos de *Tenebrio molitor* - Referência: Placa 7 (Oligonucleotídeos ISSR 812 e 825) Ta: 47°C.

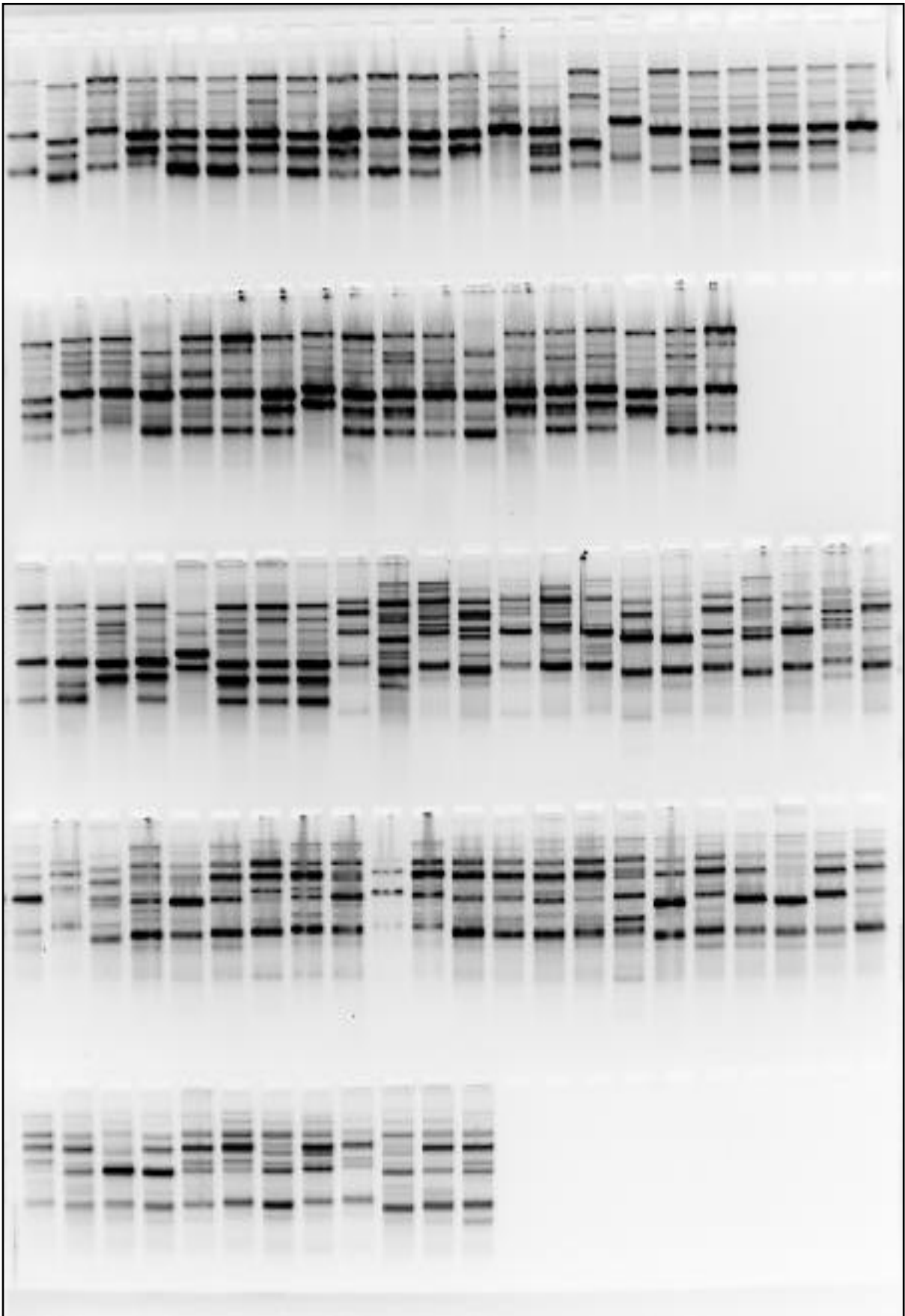


**Figura 14.** Padrão eletroforético a partir das ampliações via PCR dos genomas de 48 acessos de *Tenebrio molitor* - Referência: Placa 8 (Oligonucleotídeos ISSR 827 e 847) Ta: 47°C.

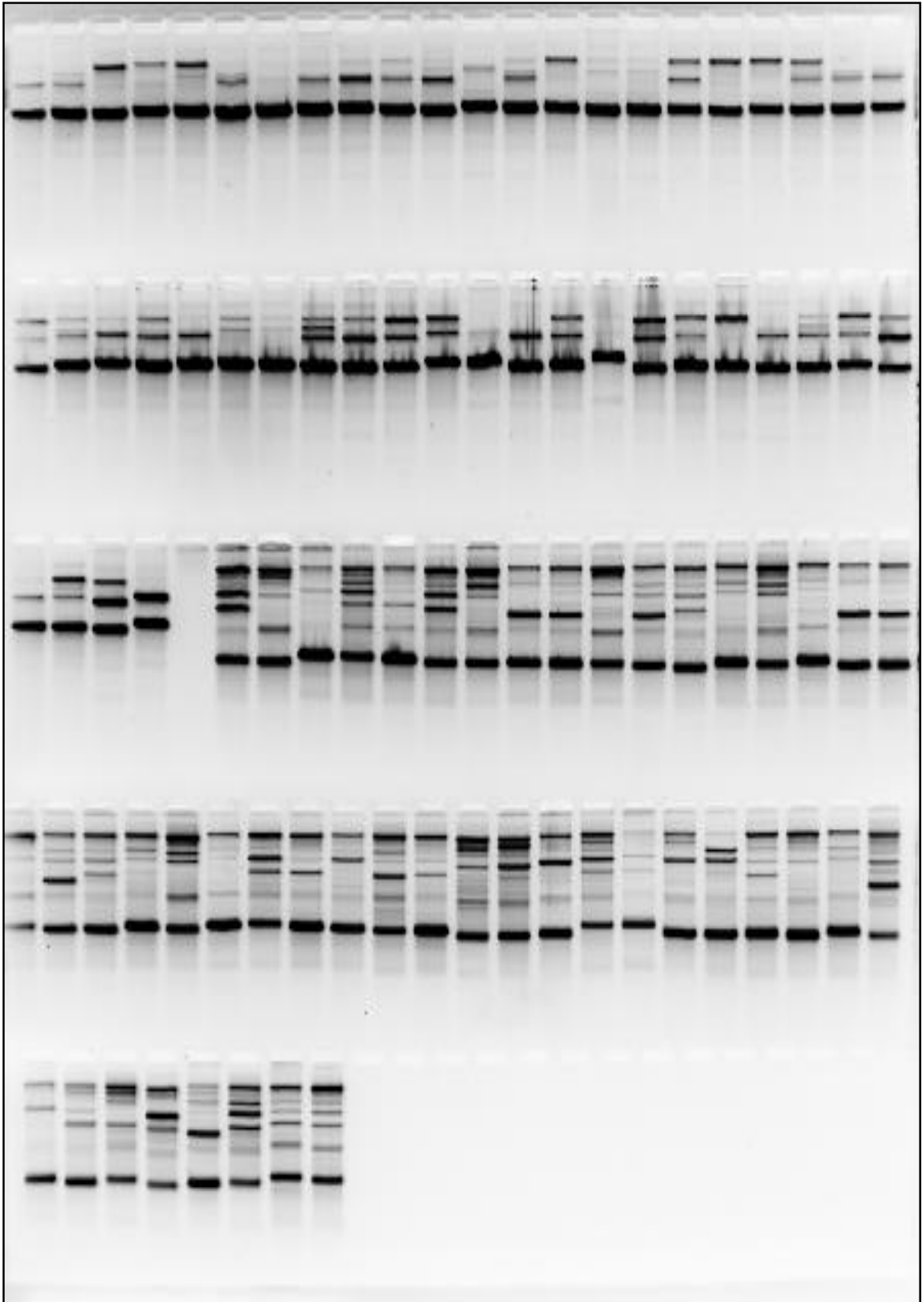


**Figura 15.** Padrão eletroforético a partir das ampliações via PCR dos genomas de 48 acessos de *Tenebrio molitor* - Referência: Placa 9 (Oligonucleotídeos ISSR 849 e 855) Ta: 47°C.

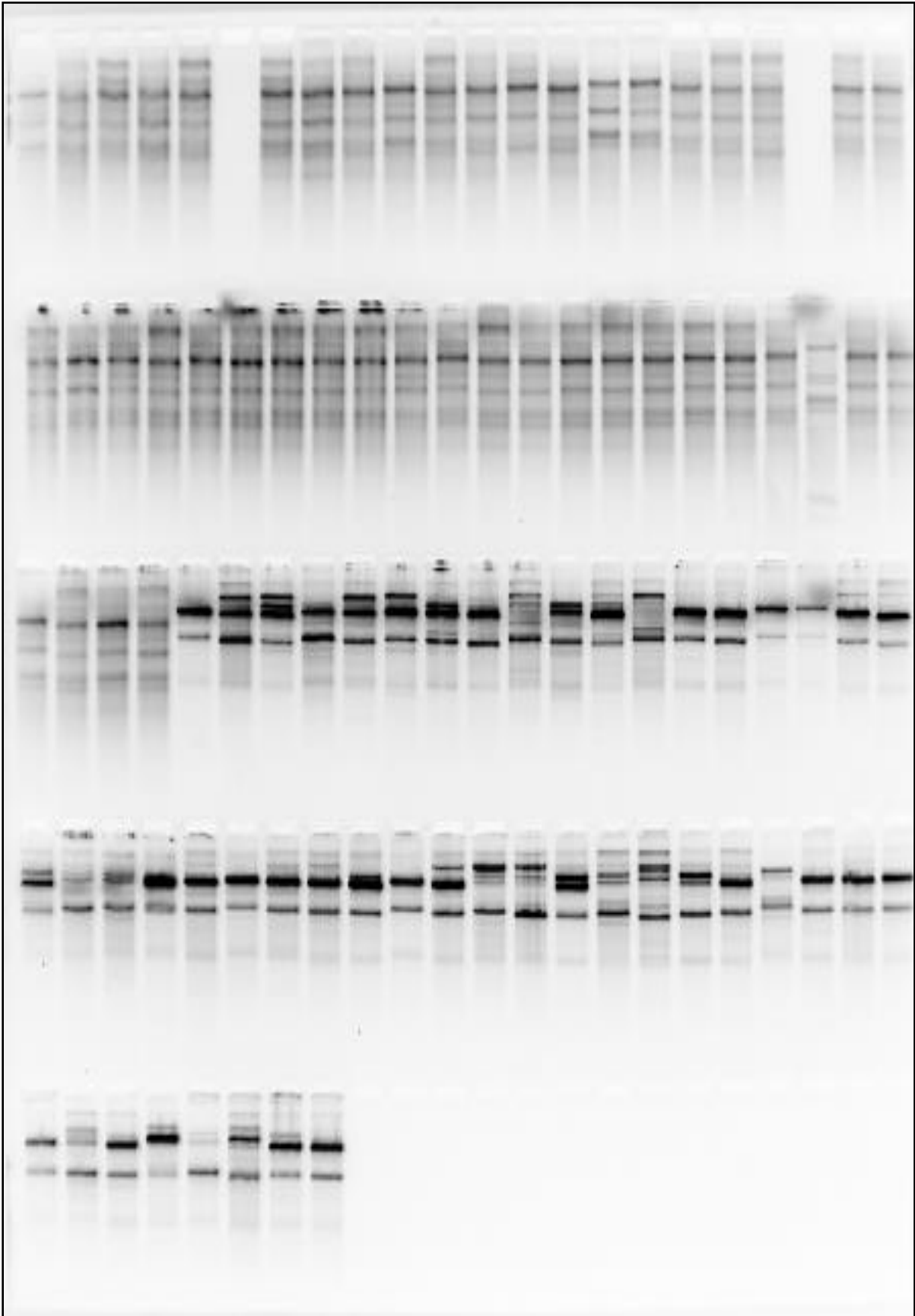




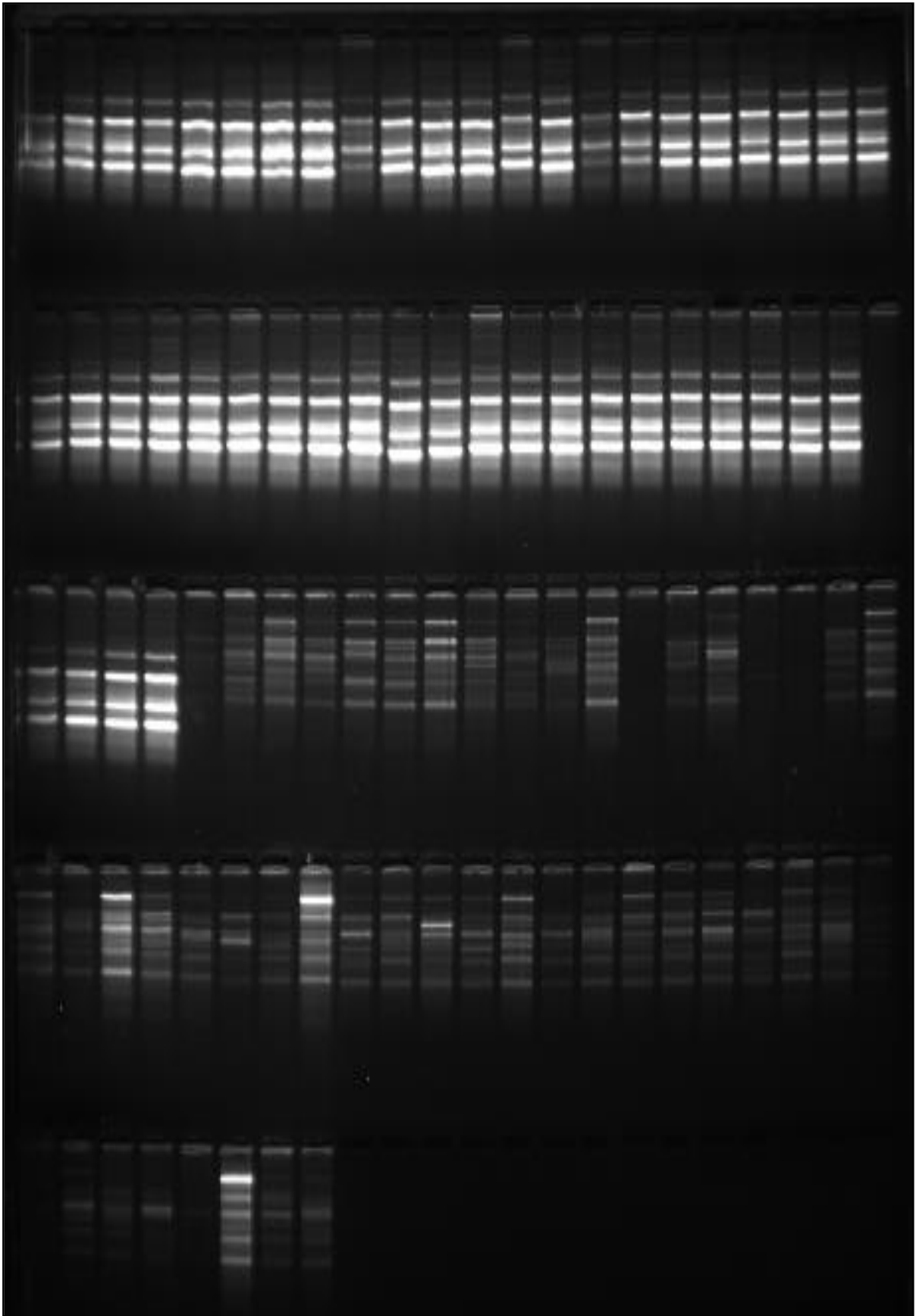
**Figura 16.** Padrão eletroforético a partir das ampliações via PCR dos genomas de 48 acessos de *Tenebrio molitor* - Referência: Placa 10 (Oligonucleotídeos ISSR 818 e 876) Ta: 48°C.



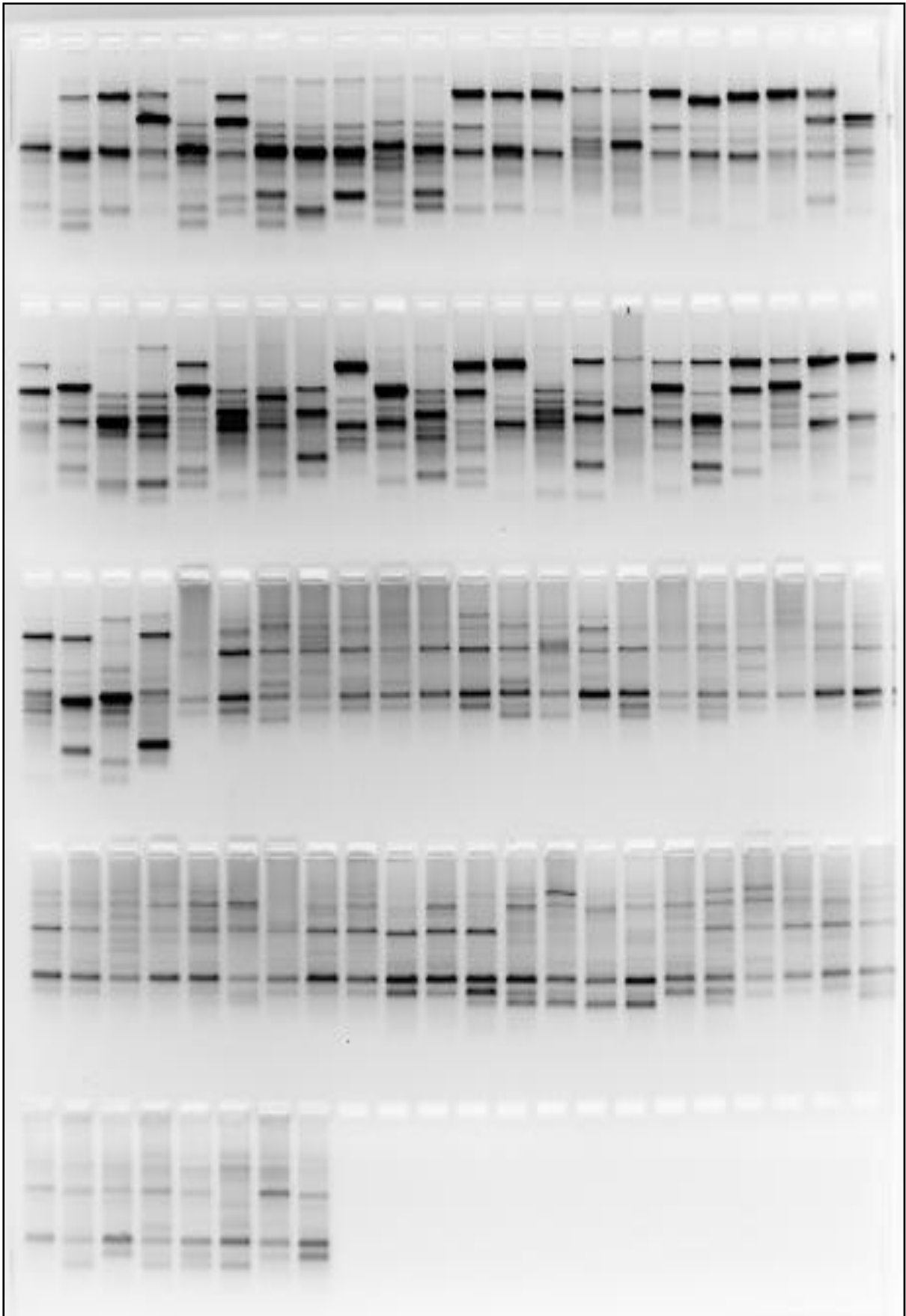
**Figura 17.** Padrão eletroforético a partir das ampliações via PCR dos genomas de 48 acessos de *Tenebrio molitor* - Referência: Placa 11 (Oligonucleotídeos ISSR 864 e 886) Ta: 51°C.



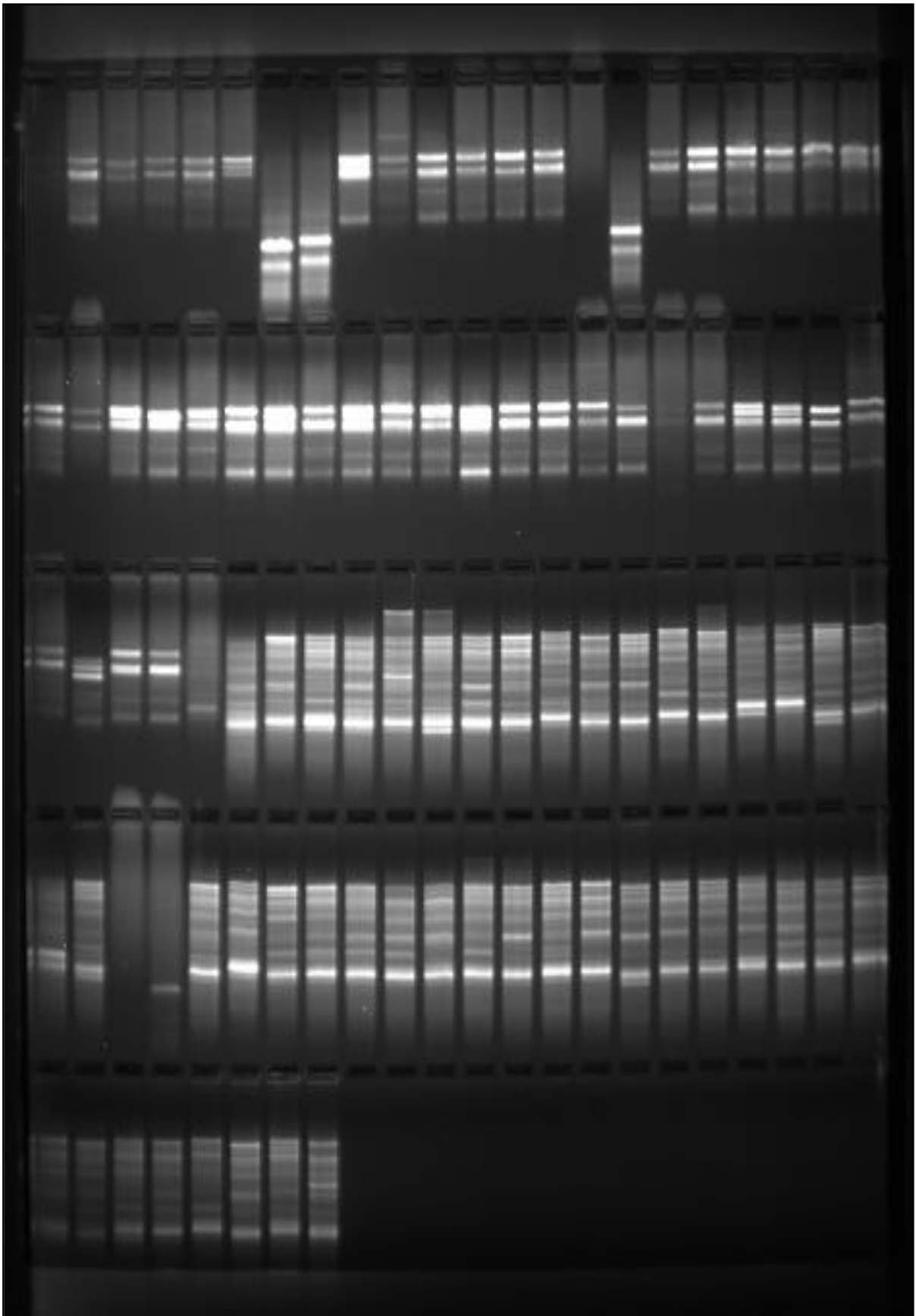
**Figura 18.** Padrão eletroforético a partir das ampliações via PCR dos genomas de 48 acessos de *Tenebrio molitor* - Referência: Placa 12 (Oligonucleotídeos ISSR 865 e 887) Ta: 51°C.



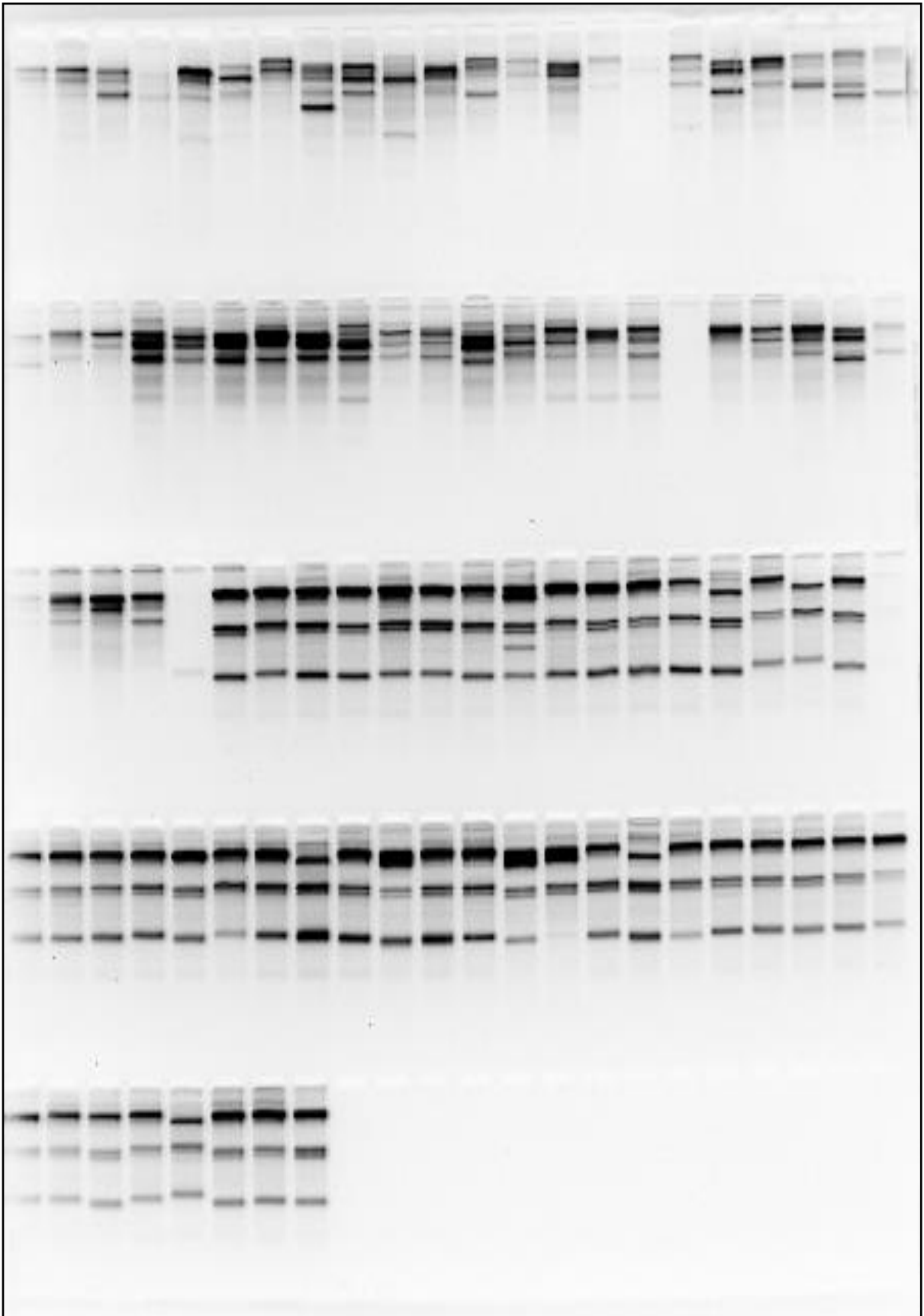
**Figura 19.** Padrão eletroforético a partir das ampliações via PCR dos genomas de 48 acessos de *Tenebrio molitor* - Referência: Placa 13 (Oligonucleotídeos ISSR 807 e 830) Ta: 54°C.



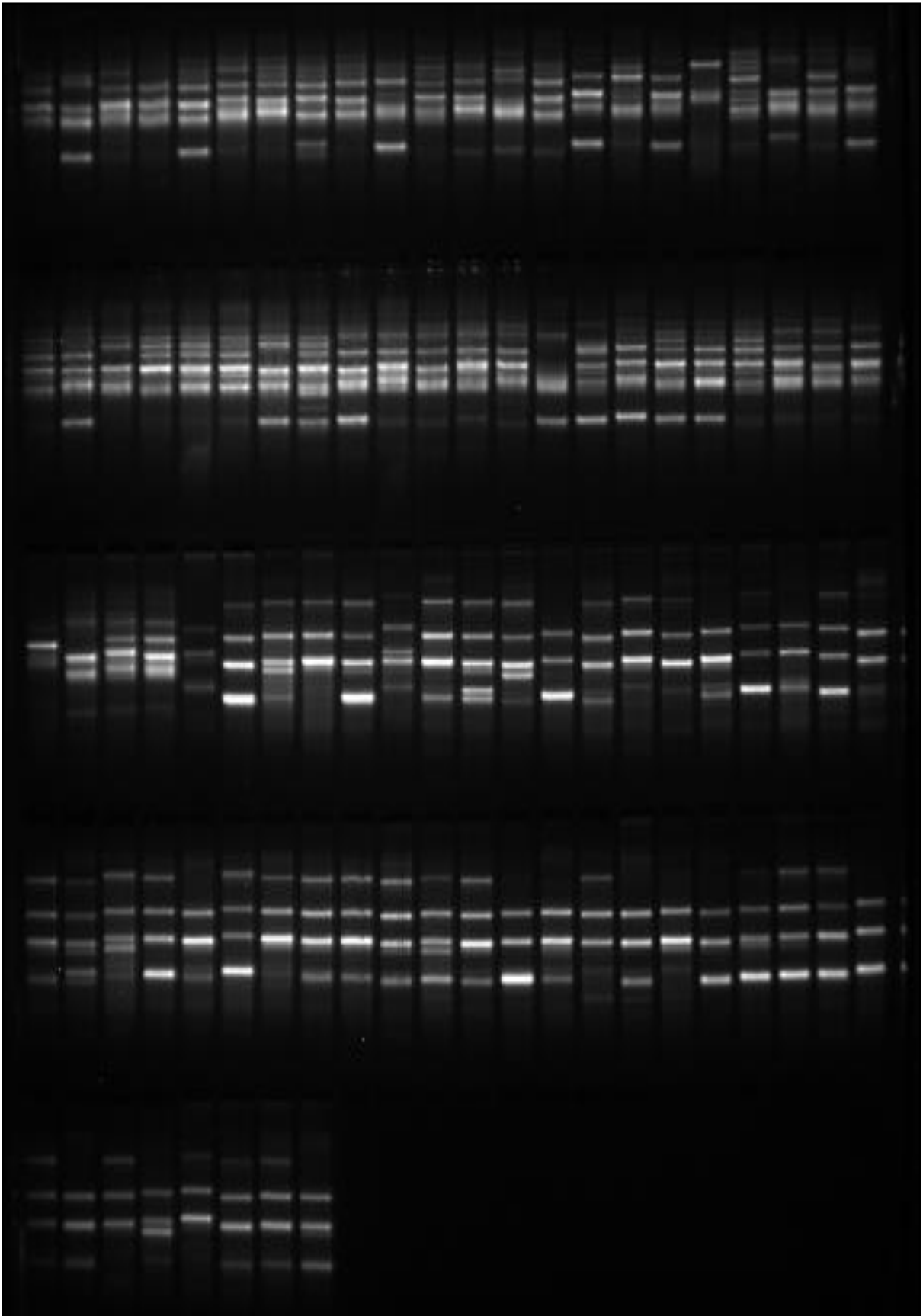
**Figura 20.** Padrão eletroforético a partir das ampliações via PCR dos genomas de 48 acessos de *Tenebrio molitor* - Referência: Placa 14 (Oligonucleotídeos ISSR 842 e 856) Ta: 56°C.



**Figura 21.** Padrão eletroforético a partir das ampliações via PCR dos genomas de 48 acessos de *Tenebrio molitor* - Referência: Placa 15 (Oligonucleotídeos ISSR 858 e 867) Ta: 59°C.

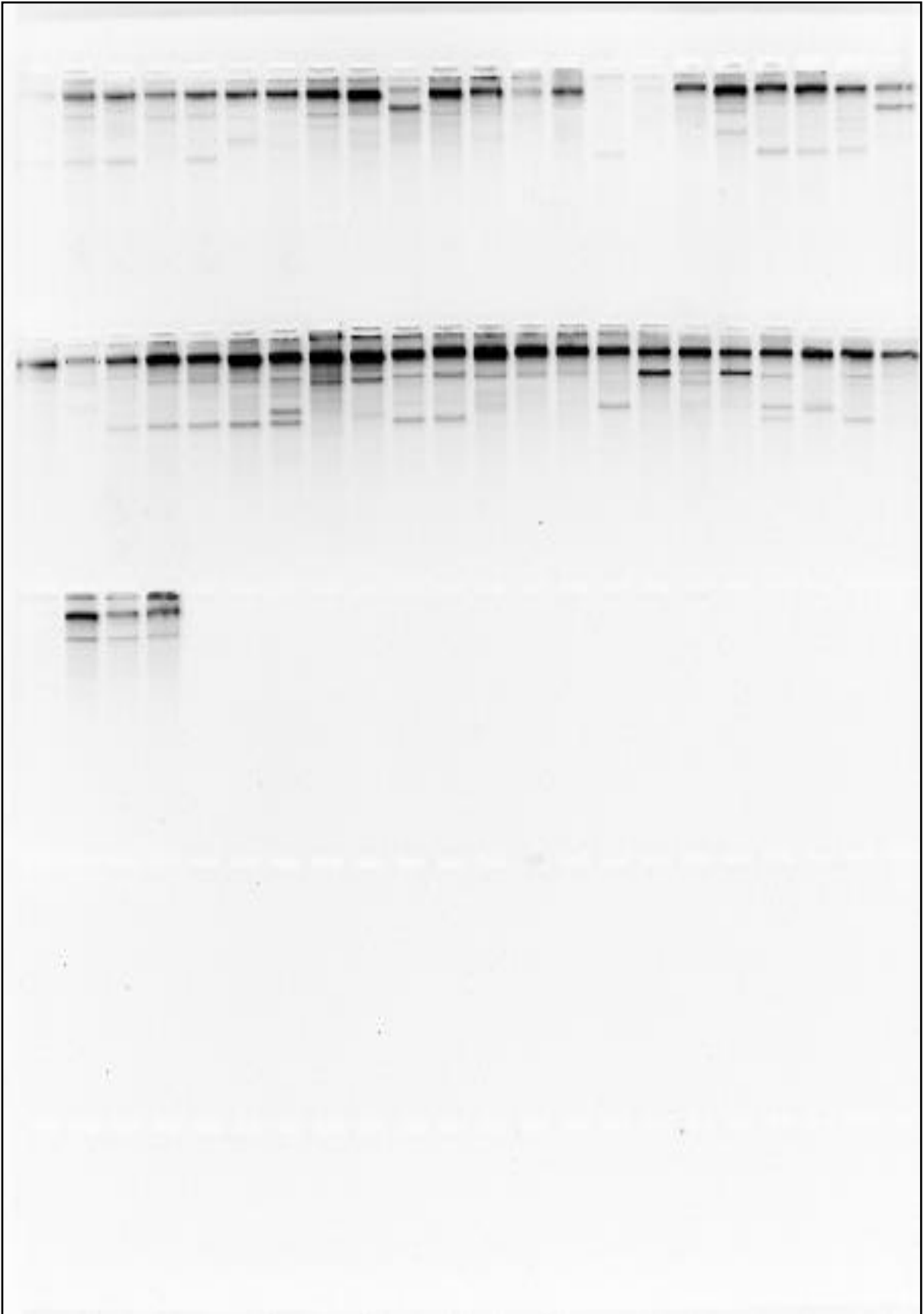


**Figura 22.** Padrão eletroforético a partir das ampliações via PCR dos genomas de 48 acessos de *Tenebrio molitor* - Referência: Placa 16 (Oligonucleotídeo ISSR 855) Ta: 47°C; Placa 17 (Oligonucleotídeo ISSR 848) Ta: 49°C.



**Figura 23.** Padrão eletroforético a partir das ampliações via PCR dos genomas de 48 acessos de *Tenebrio molitor* - Referência: Placa 18 (Oligonucleotídeo ISSR 889) Ta: 51°C; Placa 19 (Oligonucleotídeo ISSR 888) Ta: 54°C.





**Figura 24.** Padrão eletroforético a partir das ampliações via PCR dos genomas de 48 acessos de *Tenebrio molitor* - Referência: Placa 20 (Oligonucleotídeo ISSR 866) Ta: 56°C.