

Universidade de Brasília – UnB  
Instituto de Ciências Biológicas – IB  
Programa de pós-graduação em Biologia Animal

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DESENVOLVIMENTO  
DE MARCADORES ESPECÍFICOS PARA A DETECÇÃO DE  
BIÓTIPOS DE MOSCA BRANCA *Bemisia tabaci*

Paulo Roberto Queiroz da Silva

Brasília  
2006

Universidade de Brasília – UnB  
Instituto de Ciências Biológicas – IB  
Programa de pós-graduação em Biologia Animal

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DESENVOLVIMENTO  
DE MARCADORES ESPECÍFICOS PARA A DETECÇÃO DE  
BIÓTIPOS DE MOSCA BRANCA *Bemisia tabaci*

Paulo Roberto Queiroz da Silva

Tese apresentada ao programa de Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas (IB) da Universidade de Brasília (UnB) como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Animal.

Brasília – DF  
Abril de 2006



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

## TESE DE DOUTORADO

Paulo Roberto Queiroz

### Título

"Caracterização molecular e desenvolvimento de marcadores  
específicos para detecção de biótipos de mosca branca *Bemisia  
tabaci*"

Comissão Examinadora:

*Prof. Dra. Maria de Nazaré Klautau Guimarães Grisólia*  
Universidade de Brasília  
Presidente/orientadora

*Prof. Dra. Maura Helena Manfrim*  
Membro Titular Externo Não Vinculado ao Programa  
USP

*Prof. Dra. Silene de Paulino Lozzi*  
Membro Titular Interno Vinculado ao Programa  
UnB

*Prof. Dr. Márcio José Poças Fonseca*  
Membro Titular Interno Não Vinculado ao Programa  
UnB

*Dra. Ângela Mehta*  
Membro Titular Externo Não Vinculado ao Programa  
EMBRAPA-CENARGEN

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular, do Núcleo Temático de Segurança Biológica (NTSB) da Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF.

Orientadora:

Dra. Maria de Nazaré Klautau Guimarães Grisólia.

Co-orientadora:

Dra. Luzia Helena Corrêa Lima.

## Dedicatória

À minha mãe,  
por me mostrar que mesmo diante da tormenta,  
é possível vislumbrar a beleza do sol que vem em  
seguida.

Por me mostrar que a verdadeira prova de amor  
é se doar, diariamente, sem pedir nada em troca.

Por ser aquela que oferece o ombro amigo e que  
tem sempre uma palavra encorajadora.

Por me mostrar que ser homem é ser capaz de  
assumir, com coragem, as responsabilidades que a  
vida nos impõe.

Dedico e te amo muito.

## Oferecimento

À minha orientadora, mentora, amiga e, sobretudo, mãe...

...Luzia Helena Corrêa Lima.

Por sempre ter estado ao meu lado ao longo de toda a minha formação acadêmica e ser influência decisiva naquilo que eu acredito que seja um profissional de verdade.

De nada adianta a habilidade e a técnica se a humanidade é deixada de lado.

Pelo verdadeiro exemplo de ser humano e pela interminável “paciência” de suportar o meu gênio. Só as mães fazem isso...

Ofereço de coração e espírito.

## **Agradecimentos**

À Deus,

pela mãe que me destes e por ter um espírito de luz chamado Luzia a iluminar os meus caminhos...

...pela possibilidade de ser um amante da Biologia e pelos ensinamentos diários.

...Te agradeço e Te dedico.

À minha orientadora Nazaré,

Pela empolgação na realização dos trabalhos, pela liberdade e confiança em acreditar no meu esforço de estar fazendo sempre o melhor. Por permitir que meu sonho se torne realidade...

À Zulmira,

Pela dedicação e pelo carinho em me acompanhar ao longo dessa jornada. Por mostrar qual era o caminho certo a ser seguido...

Aos amigos...

...não irei citá-los pois, se esquecer um, estarei cometendo uma grande injustiça. Sem vocês a viagem seria sem brilho e alegria.

O maior tesouro que um homem pode ter não são os títulos que ele acumula ao longo da vida e, sim, os amigos que possui para compartilhar o pão e a vitória.

Aos inimigos e invejosos...

...esses eu nem cito, mas agradeço pois, a pedra que é jogada, a palavra vociferada e a citação jocosa, só me fizeram mostrar que estava no caminho certo...

...só se atira pedra nas árvores que dão bons frutos!!!

## **Agradecimentos Especiais**

Aos meus tios, padrinhos e pais, Afro Moura Negrão e Maria Aparecida Queiroz Negrão...

...dizer que amo vocês é muito pouco diante de tanto carinho e ajuda ao longo da vida. Agradeço por mim e pela minha mãe.

Às irmãs Rita, Fernanda e Cláudia, pelas brigas, broncas, amizade, admiração, orientação espiritual e amor.

Ao meu irmão caçula e afilhado, Marco Antônio, pelo convívio, amizade e companheirismo, sentimentos que são dignos apenas das pessoas puras de coração.

À minha paixão, Beatriz.

..."Sobrinha que aprende rápido os ensinamentos do tio".

Ao Monteiro e família, pela torcida, alegria, apoio e confiança que tudo, no final, dá certo.

Às minhas paixões, Alonso e Edna, por toda a torcida e pela profunda admiração e carinho que tenho por vocês. Simplesmente, adoro...

Aos meus cunhados, Sérgio, Marlon e Kênia, Gierck e Shirley, Marlos e "... " pelos bons momentos e risadas.

À Universidade de Brasília – UnB, caso desavergonhado de amor, paixão nada escondida e namoro desde a barriga da mãe...

À Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia pela minha formação profissional e maturidade científica...

Ao UniCEUB, pelo exercício da profissão e confiança no meu potencial.

Nada disso seria possível sem alguém muito especial...

À Érica,

Pelo companheirismo, cumplicidade, dedicação, segurança e carinho...

Pela admiração em ver a sua determinação de conseguir o que quer...

Pelas dores e sofrimentos compartilhados (masoquista!!!!)...

Pela alegria e confiança de que tudo será sempre melhor...

Só posso dizer...

Te amo muito.

## Homenagem

*(in memorium)*

Ao meu tio Paulo Queiroz, exemplo de filho, marido, pai e homem e cujas lições de coragem, fé inabalável, persistência e luta perante a enfermidade, servirão como uma lição de que a vida e o amor são os maiores legados deixados por Deus.

## Carinho Muito Especial

Aos amigos da Seção de Registros Funcionais do

Departamento de Polícia Federal

A todos vocês que me acompanharam e, muitas vezes, me ajudaram nas tarefas escolares e nos trabalhos da faculdade, serei eternamente grato, pois aprendi muito a respeito do carinho e do fazer sem nada querer em troca.

Dizer muito obrigado ainda é pouco, diante das verdadeiras lições que vocês me deram. Vocês são os meus maiores mestres.

Obrigado de coração.

## Abreviaturas

A	Adenina
Amp <sup>r</sup>	Resistência ao antibiótico ampicilina
C	Citosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dH <sub>2</sub> O	Água destilada
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
g	grama
g.L <sup>-1</sup>	grama por litro
G	Guanina
h	hora
HCl	Ácido clorídrico
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kb	quilobase (10 <sup>3</sup> pb)
kDa	quiloDalton (10 <sup>3</sup> Da)
KCl	Cloreto de potássio
L	litro
min	minuto
mg	miligrama (10 <sup>-3</sup> g)
mL	mililitro (10 <sup>-3</sup> L)
mM	milimolar
M	molar (mol L <sup>-1</sup> )
Mb	Megabases (10 <sup>6</sup> pb)
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
μg	micrograma (10 <sup>-6</sup> g)
μg.mL <sup>-1</sup>	micrograma por mililitro
μg.μL <sup>-1</sup>	micrograma por microlitro
μL	microlitro (10 <sup>-6</sup> L)
μM	micromolar (10 <sup>-6</sup> M)
ng	nanograma (10 <sup>-9</sup> g)
nm	nanômetro (10 <sup>-9</sup> m)

nmol	nanomol ( $10^{-9}$ mol)
ng. $\mu$ L <sup>-1</sup>	nanograma por microlitro
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
pb	pares de base
pg	picograma ( $10^{-12}$ g)
pH	potencial de hidrogênio
RNA	Ácido ribonucleico
RNaseA	Ribonuclease A
rpm	rotação por minuto
s	segundo
T	Timina
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Tween 20	Polioxietileno sorbitan monolaurato 20
U	Uracila
U. $\mu$ L <sup>-1</sup>	Unidade por microlitro
xg	unidade gravitacional
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D- galactopiranosídeo
°C	Grau Celsius
% (p/v)	Porcentagem (peso/volume)
% (v/v)	Porcentagem (volume/volume)

## RESUMO

A mosca-branca (*Bemisia tabaci*) tem assumido um papel de destaque na agricultura mundial por ser uma praga de importância econômica em função das infestações causadas pelo biótipo B de *B. tabaci* e que já se encontra distribuído em todos os continentes. O conhecimento da diferenciação genética de *B. tabaci* permitirá o desenvolvimento de estratégias para o controle da mosca-branca no Brasil. O presente estudo teve como objetivo caracterizar e analisar a variabilidade genética da mosca-branca *B. tabaci*, por meio de marcadores moleculares baseados em DNA. Os dados de caracterização molecular por RAPD, revelaram a extrema complexidade da espécie sugerindo uma possível separação das populações em função da planta hospedeira. Posteriormente, os dados de variância molecular revelaram que, a maior fonte de variabilidade era originária de diferenças entre as populações, do que em relação a variações dentro das populações do biótipo B desse inseto. Observou-se, ainda, que o biótipo BR, nativo do Brasil, apresentou baixa similaridade genética em relação ao biótipo B, que foi introduzido no país. Sendo assim, fragmentos de RAPD de ocorrência persistente nas populações estudadas dos biótipos B e BR, foram clonados e seqüenciados, seguindo-se o desenvolvimento de dois conjuntos de *primers*, para a detecção do biótipo B e um para a detecção do biótipo BR. Esses marcadores denominados SCAR (Seqüências Caracterizadas de Regiões Amplificadas) mostraram-se sensíveis para a detecção dos biótipos em questão, sendo capazes de discriminá-los em testes utilizando amostras de DNA provenientes de diferentes insetos. Os resultados obtidos permitem propor um modelo para a dispersão do biótipo B em campo. Possivelmente, as fêmeas de *B. tabaci* biótipo B adotam um sistema multifatorial (detecção de predadores, interferência por machos de outros biótipos, disponibilidade de recursos e competição entre populações de um mesmo biótipo) para a seleção das culturas hospedeiras. Independente do fenômeno ocorrido em relação à cultura hospedeira selecionada pelo biótipo B de *B. tabaci*, os marcadores SCAR foram capazes de detectar os dois biótipos de ocorrência no Brasil. O desenvolvimento de marcadores específicos para cada biótipo de *B. tabaci* é uma etapa decisiva para o estabelecimento de estratégias baseadas em DNA para a detecção e a prevenção da entrada de novos biótipos no Brasil, minimizando os riscos provocados pela entrada de insetos exóticos no agro-ecossistema brasileiro.

## ABSTRACT

The whitefly *Bemisia tabaci* has assumed an increasing importance because it is one of the most harmful pests of plant production. An increasing number of plant diseases were related to the B biotype of *B. tabaci*. This biotype is the most widespread pest of economically important plant crops. The understanding of the genetic differentiation of *B. tabaci* allows the development of methods to control this pest in many countries, including Brazil. The objective of this study was the characterization and analysis of the genetic variability of the *B. tabaci* using DNA based molecular markers. The molecular characterization by RAPD revealed the extreme complexity of this species suggesting possible population segregation by host culture. The molecular variance analysis (AMOVA) revealed that the highest genetic variability were more due to variations among the populations analyzed than genetic variation in the populations of the B biotype of *B. tabaci*. The native *B. tabaci* biotype (called BR) showed low genetic similarity to the introduced *B. tabaci* B biotype. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fragments occurring persistently in all B and BR populations studied were cloned, sequenced, and used to design two sets of SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) primers to detect the B biotype and one to detect the BR biotype. These SCAR markers were very sensitive to discriminate the two biotypes analyzed in this study. The specific biotype detection occurred in several conditions, including tests using DNA extracted from different insect sources. These molecular results could be used in a proposition of a model trying to explain the dispersion of *B. tabaci* in the field. Possibly, the *B. tabaci* B biotype females could adopt a multifactorial system to select its host crops. This system could be formed by factors like detection of predators of its offspring, interference by males from different biotypes, availability of plant resources, and competition among populations of the same biotype. Independently of which factors were interfering or influencing on *B. tabaci* to take a decision about host plant, the SCAR markers developed in this study were able to detect the most common *B. tabaci* biotypes occurring in Brazil. The development of specific molecular markers to each *B. tabaci* biotypes is a very important step to the establishment of DNA based strategies to detect and prevent the incoming of new biotypes of whiteflies in Brazil, reducing the risks produced by the introduction of exotic insects in the Brazilian agricultural system.

# Índice

Dedicatória .....	v
Oferecimento.....	vi
Agradecimentos .....	vii
Agradecimentos especiais.....	viii
Abreviaturas.....	xii
Resumo .....	xiv
Abstract.....	xv
Índice de figuras.....	xviii
Índice de tabelas.....	xxii

## INTRODUÇÃO GERAL

Características biológicas, variabilidade genética e impacto econômico causados pela mosca branca <i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae) .....	1
Resumo .....	1
Introdução.....	2
Objetivo Geral .....	14
Hipótese .....	14
Referências Bibliográficas.....	15

## CAPÍTULO 1

Identificação molecular e análise da variabilidade genética da mosca branca <i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae).....	26
Resumo .....	26
Introdução.....	27
Objetivos.....	34
Metodologia.....	35
Resultados e Discussão.....	45
Referências Bibliográficas.....	95

## CAPÍTULO 2

Desenvolvimento de Marcadores SCAR para a Identificação de Biótipos de <i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae).....	101
Resumo .....	101
Introdução.....	102
Objetivos.....	108
Metodologia.....	108
Resultados e Discussão.....	119
Referências Bibliográficas.....	147
Conclusão Geral .....	151

## Índice de figuras

Figura 1 – Identificação de populações de mosca branca coletadas em culturas de várias localidades por meio de perfis de fragmentos de DNA obtidos com o primer OPA-13.....	46
Figura 2 – Padrões de bandas obtidos de amplificação com o primer OPA-10 dos biótipos de mosca branca.....	49
Figura 3 – Distribuição das populações de <i>B. tabaci</i> nas diversas unidades da federação.....	50
Figura 4 – Comparação de perfis de fragmentos de DNA de mosca branca obtidos a partir de ampliações com os primers OPA-04 e OPA-11.....	53
Figura 5 – Análise de agrupamento de populações de aleirodídeos coletadas em culturas de mandioca do Brasil e do Paraguai.....	54
Figura 6 - Análise dos fragmentos de DNA obtidos com o primer OPA-13.....	60
Figura 7 - Análise de agrupamento das populações de <i>B. tabaci</i> coletadas em diferentes culturas das regiões do Brasil e dos Estados Unidos.....	61
Figura 8 - Análise dos fragmentos de DNA obtidos com o primer OPA-02.....	64
Figura 9 - Análise de agrupamento das populações de <i>B. tabaci</i> coletadas em culturas localizadas em diferentes regiões do Brasil.....	65
Figura 10 – Análise dos fragmentos de DNA, de amostras coletadas em 2000, obtidos de amplificação com o primer OPA-13.....	69
Figura 11 – Análise dos fragmentos de DNA, de amostras coletadas em 2001, obtidos de amplificação com o primer OPA-13.....	69
Figura 12 - Análise dos fragmentos de DNA de mosca branca, obtidos de amplificação com o primer OPA-15 a partir de populações coletadas no ano de 2000, em tomate e em berinjela.....	70
Figura 13 - Análise dos fragmentos de DNA de mosca branca, obtidos de amplificação com o primer OPA-15 em populações coletadas em campo no ano de 2001, tanto em tomate quanto em berinjela.....	70
Figura 14 – Análise das populações de <i>B. tabaci</i> coletadas no ano de 2000 em culturas mantidas tanto em casa de vegetação quanto em campo.....	71
Figura 15 – Análise das populações de <i>Bemisia</i> coletadas no ano de 2001 em culturas mantidas tanto em casa de vegetação quanto em campo.....	73
Figura 16 – Análise das populações de <i>Bemisia</i> coletadas em culturas originárias de várias localidades do Brasil ao longo do ano de 1999.....	75

Figura 17 - Análise dos fragmentos de DNA dos vários biótipos de <i>B. tabaci</i> obtidos de amplificação com o primer OPA-10.....	78
Figura 18 – Análise de populações dos vários biótipos de <i>B. tabaci</i> presentes no Brasil e em outros países.....	80
Figura 19 - Análise dos fragmentos de DNA de várias populações de aleirodídeos, obtidos de amplificação com os primers OPA-03, OPA-04 e OPA-10.....	83
Figura 20 - Análise das populações de aleirodídeos coletadas em diferentes culturas.....	85
Figura 21 – Perfis de marcadores moleculares gerados pela técnica de RAPD utilizando-se os primers OPA-04 e OPA-13.....	87
Figura 22 – Determinação do grau de similaridade entre várias populações de insetos pertencentes a diferentes famílias taxonômicas.....	89
Figura 23 – Fragmentos de RAPD produzidos a partir do DNA extraído dos biótipos de <i>B. tabaci</i> .....	120
Figura 24 – Digestões de plasmídios resultantes da clonagem de vários fragmentos de RAPD a partir dos biótipos B e BR de <i>B. tabaci</i> .....	121
Figura 25 – Composição de nucleotídios do fragmento de 831 pb obtido do biótipo B de <i>B. tabaci</i> com o primer OPA-10.....	122
Figura 26 – Perfil de sítios de restrição distribuídos ao longo da seqüência de 831 pb originada a partir da amplificação do DNA de <i>B. tabaci</i> biótipo B com o uso do primer OPA-10 de RAPD.....	123
Figura 27 – Composição de nucleotídios do fragmento de 582 pb obtido do biótipo B de <i>B. tabaci</i> com o primer OPA-13.....	124
Figura 28 – Perfil de sítios de restrição distribuídos ao longo da seqüência de 582 pb originada a partir da amplificação do DNA de <i>B. tabaci</i> biótipo B com o uso do primer OPA-13 de RAPD.....	125
Figura 29 – Composição de nucleotídios do fragmento de 793 pb obtido do biótipo BR de <i>B. tabaci</i> com o primer OPA-15.....	126
Figura 30 – Perfil de sítios de restrição distribuídos ao longo da seqüência de 794 pb originada a partir da amplificação do DNA de <i>B. tabaci</i> biótipo BR com o uso do primer OPA-15 de RAPD.....	127
Figura 31 – Reações de SCAR utilizando-se o primer BT-B1 para a detecção do biótipo B de <i>B. tabaci</i> .....	129

Figura 32 – Reações de SCAR utilizando-se o primer BT-B1 para a detecção do biótipo B de <i>B. tabaci</i> entre várias amostras de insetos de diferentes famílias ou gêneros.....	130
Figura 33 – Uso do <i>primer</i> BT-B1 para a detecção do biótipo B quando comparado com outros biótipos de <i>B. tabaci</i> .....	131
Figura 34 – Reações de SCAR com o <i>primer</i> BT-B3.....	132
Figura 35 – Teste do <i>primer</i> BT-B3 para a detecção do biótipo B quando comparado com outros biótipos de <i>B. tabaci</i> .....	132
Figura 36 – Reações de SCAR com o <i>primer</i> BT-BR1.....	134
Figura 37 – Teste do <i>primer</i> BT-BR1 para a detecção do biótipo BR quando comparado com outros biótipos de <i>B. tabaci</i> .....	135
Figura 38 – Perfis de marcadores RAPD obtidos com o primer OPA-13 a partir de amostras de diferentes espécies de insetos.....	136
Figura 39 – Teste de eficiência dos <i>primers</i> BT-B1 e BT-B3 para a detecção do biótipo B de <i>B. tabaci</i> a partir de vestígios do inseto como também quando comparados com machos e fêmeas.....	137
Figura 40 – Teste de determinação das quantidades máximas de contaminação em uma amostra de DNA do biótipo B de <i>B. tabaci</i> ainda viável para a identificação molecular com os <i>primers</i> de SCAR BT-B1 e BT-B3.....	138
Figura 41 – Teste de determinação das quantidades máximas de contaminação em uma amostra de DNA do biótipo BR de <i>B. tabaci</i> ainda viável para a identificação molecular com o <i>primer</i> de SCAR BT-BR1.....	139
Figura 42 – Detecção do biótipo B de <i>B. tabaci</i> sob diferentes condições de monitoramento.....	140
Figura 43 – Identificação do biótipo B de <i>B. tabaci</i> em rotina de laboratório empregando-se o <i>kit</i> diagnóstico BT-B1 a partir de amostras coletadas em localidades do estado do Maranhão.....	141
Figura 44 – Perfil de marcadores RAPD obtidos com o <i>primer</i> OPA-10 a partir de amostras coletadas em localidades do Maranhão.....	142
Figura 45 – Identificação do biótipo B de <i>B. tabaci</i> em rotina de laboratório empregando-se o <i>kit</i> diagnóstico BT-B3 a partir de amostras coletadas em localidades do estado do Maranhão.....	143
Figura 46 – Perfil de marcadores RAPD obtidos com o <i>primer</i> OPA-13 a partir de amostras coletadas em localidades do Maranhão.....	144

Figura 47 – Modelo descritivo para a dispersão e a instalação de populações de <i>B. tabaci</i> biótipo B em diferentes culturas distribuídas em várias áreas geográficas.....	152
Figura 48 – Fluxograma para a tomada de decisões quanto à utilização dos <i>primers</i> de SCAR e para a detecção e a identificação de biótipos de <i>B. tabaci</i> .....	154

## Índice de tabelas

Tabela 1 – <i>Primers</i> de RAPD utilizados na determinação dos perfis eletroforéticos das diversas populações de insetos submetidas à análise molecular.....	37
Tabela 2 – Populações de mosca branca ocorrendo em culturas de mandioca no Brasil e Paraguai, utilizadas nos estudos de identificação e caracterização moleculares.....	39
Tabela 3 – Populações de <i>B. tabaci</i> coletadas em várias regiões do Brasil e utilizadas nos estudos de variabilidade genética.....	40
Tabela 4 – Populações de <i>B. tabaci</i> coletadas no Distrito Federal nos anos de 2000 e 2001 e em outras regiões do Brasil no ano de 1999.....	41
Tabela 5 – Biótipos de <i>Bemisia tabaci</i> usados nos estudos de determinação de perfis de marcadores moleculares de RAPD.....	42
Tabela 6 – Populações de aleirodídeos utilizados nas determinações dos perfis de marcadores de RAPD para a identificação molecular.....	43
Tabela 7 – Populações de insetos utilizadas nas determinações dos perfis de marcadores de RAPD.....	44
Tabela 8 – Identificação molecular das amostras recebidas no ano de 2000.....	47
Tabela 9 – Identificação molecular das amostras recebidas no ano de 2001.....	48
Tabela 10 – Identificação por meio de três <i>primers</i> de RAPD de populações de mosca branca coletadas em culturas de mandioca, provenientes do Brasil e do Paraguai, a serem utilizadas nos estudos de caracterização molecular.....	52
Tabela 11 – Populações de <i>B. tabaci</i> coletadas em culturas de várias regiões do Brasil usadas nos estudos de variabilidade genética.....	59
Tabela 12 – Análise de variância molecular (AMOVA) entre as populações coletadas em várias culturas e entre os indivíduos de uma mesma população.....	62
Tabela 13 – Populações de <i>B. tabaci</i> usadas nos estudos complementares de variabilidade genética coletadas em várias regiões do Brasil.....	63
Tabela 14 – Populações de <i>Bemisia</i> coletadas no Distrito Federal nos anos de 2000 e 2001 e no Brasil no ano de 1999.....	68
Tabela 15 – Fragmentos de DNA obtidos pelo emprego de vários <i>primers</i> de RAPD candidatos ao desenvolvimento de marcadores moleculares específicos (SCAR) para a identificação dos biótipos B e BR de <i>B. tabaci</i> .....	94

Tabela 16 – Biótipos de <i>B. tabaci</i> utilizados nos experimentos de desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo SCAR.....	108
Tabela 17 – <i>Primers</i> de RAPD utilizados na obtenção dos perfis de bandejamento entre os biótipos de <i>B. tabaci</i> .....	110
Tabela 18 – Insetos utilizados na análise da especificidade dos <i>primers</i> de SCAR para <i>B. tabaci</i> .....	114
Tabela 19 – Indivíduos de <i>B. tabaci</i> utilizados na detecção dos marcadores SCAR em partes do inseto ou em função do gênero.....	117
Tabela 20 – Amostras utilizadas em rotina de detecção do biótipo B de <i>B. tabaci</i> utilizando-se os <i>primers</i> de SCAR.....	118
Tabela 21 – Seqüência de <i>primers</i> para reações de PCR específicas para os biótipos de <i>B. tabaci</i> .....	129

# INTRODUÇÃO GERAL

## Características biológicas, variabilidade genética e impacto econômico causado pela mosca branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae)

*O estudo em geral, a busca da verdade e da  
beleza são domínios em que nos é consentido ficar  
crianças toda a vida.*

*Albert Einstein (1879-1955).*

### RESUMO

A mosca branca (*Bemisia tabaci*) foi descrita pela primeira vez, em 1889, por Gennadius. A partir de então, passaram a constar da lista de insetos de grande importância agro-econômica, sendo que estas estão entre as pragas mais prejudiciais da agricultura contemporânea. Os danos são causados pelos adultos e ninfas tanto diretamente, atuando como pragas, provocando debilidades e desordens fitotóxicas às plantas quanto indiretamente, atuando como vetores de fitovirose, destacando-se o grupo dos geminivírus. A importância agrícola de *B. tabaci* vem do fato de que esta espécie é atualmente uma das pragas de maior expressão econômica para a agricultura mundial e muitas das epidemias relatadas têm sido identificadas como causadas pelo biótipo B, que já se encontra em todos os continentes. Sua capacidade para colonizar 600 espécies pertencentes a 74 famílias botânicas diferentes e de ser o vetor de mais de 60 diferentes fitovírus é motivo de preocupação para todas as regiões agrícolas do mundo. Além da importância dos estudos das características biológicas e genéticas soma-se, ainda, o impacto econômico ocasionado pelos biótipos de *B. tabaci*. Cada biótipo apresenta variações no grau de danos que provocam nas culturas hospedeiras. Atualmente, o biótipo B de *B. tabaci* tem sido relacionado com os maiores prejuízos agrícolas. Estima-se que nas últimas três décadas as perdas e os custos de controle provocados pelo inseto foram da ordem de bilhões de dólares. Características comuns encontradas em praticamente todas as regiões nas quais houve um ataque intensivo de populações desta espécie foram práticas

agrícolas intensivas com sobreposição de estações de cultivo, clima árido e quente, associado a uma espécie com grande potencial biótico de adaptação a inúmeros ambientes, plantas hospedeiras adequadas e uso de agrotóxicos. Recentemente, a tecnologia molecular forneceu instrumentos valiosos para a investigação de marcadores moleculares presentes nas populações naturais, dando o esclarecimento necessário sobre o comportamento e a dinâmica das populações, no seu contexto ecológico. Assim, o conhecimento da diferenciação genética da *B. tabaci* no Brasil, envolvendo populações de diferentes plantas hospedeiras, de diferentes regiões geográficas e possivelmente ocorrência de variações genéticas dentro de populações, terão implicações importantes para as estratégias de controle da mosca branca no Brasil.

## INTRODUÇÃO

A mosca branca da batata doce (*Bemisia tabaci*) também conhecida como a mosca branca do algodão, da mandioca e do fumo foi descrita pela primeira vez por Gennadius, na Grécia em 1889, como *Aleyrodes tabaci*. A introdução e o estabelecimento dessa praga nos continentes americano, asiático, africano e ilhas do Oceano Pacífico nos 50 anos subsequentes ao seu primeiro relato, levaram a uma confusão taxonômica, resultando em 23 sinonímias para a espécie. Desde a sua primeira descrição, a mosca branca recebeu inúmeras designações sendo que, Takashi (1936) e Russell (1957) reagruparam essas sinonímias dentro da espécie *B. tabaci* de acordo com as descrições morfológicas citadas para essa espécie (Perring, 2001). Posteriormente, Mound e Halsey (1978) resumiram essas informações a partir das sinonímias, ano de detecção, região geográfica e plantas hospedeiras associadas.

A grande variação morfológica associada à adaptação da arquitetura da planta e condições climáticas contribuiu para o grau de variação externa das ninfas da mosca branca sendo que atualmente, a identificação das espécies de mosca branca se faz por meio das ninfas de quarto ínstar.

A partir de então, desde o seu primeiro relato por Gennadius, as moscas brancas do gênero *Bemisia* passaram a constar da lista de insetos de grande importância agro-econômica, sendo que estas estão entre as pragas mais prejudiciais da agricultura contemporânea. As moscas brancas do gênero *Bemisia* são consideradas insetos tropicais e semitropicais e, além da reprodução capaz de gerar machos e fêmeas, apresentam

partenogênese arrenótoca, gerando apenas machos do tipo XO (Byrne & Bellows, 1991). Tanto o adulto quanto a ninfa possuem aparelho bucal do tipo picador-sugador. As mandíbulas e maxilas formam um tubo duplo (probóscide) que é usado para succionar a seiva dos canais do floema da planta atacada (Villas Bôas *et al.*, 1997).

Os danos são causados pelos adultos e ninfas tanto diretamente, atuando como pragas, provocando debilidades e desordens fitotóxicas às plantas quanto indiretamente, atuando como vetores de fitoviroses, destacando-se o grupo dos geminivírus (Oliveira *et al.*, 1997). Com relação à transmissão de vírus por mosca branca, no início dos anos 50 foram registradas várias correlações entre a presença de *B. tabaci* e sintomas de doenças caracterizadas por malformação foliar, enrolamento de folhas, nanismo e mosaico amarelo em diferentes plantas cultivadas e selvagens nas Américas e na região do Caribe (Brown e Bird, 1992). Muitas destas doenças foram posteriormente identificadas como sendo causadas por geminivírus (Brown e Bird, 1992).

No início dos anos 90, vírus transmitidos por moscas brancas já eram considerados um problema na produção de legumes. Desde então, altas incidências de geminivírus em áreas produtoras de tomate na Flórida, Caribe, México, América Central, Venezuela e Brasil têm sido registradas (Polston e Anderson, 1997).

Atualmente, a América Latina é a região mais afetada pelo complexo populacional *Bemisia tabaci*-geminivírus, tanto pelo número de culturas afetadas quanto pelas perdas na produção e área agrícola devastada. A infecção por geminivírus dentro do agrossistema ocorre de forma dinâmica. As interações são complexas e envolvem vários fatores tais como os geminivírus, os sistemas de produção, o ambiente e os biótipos do vetor. Por esta razão, a identificação dos vírus deve ser um processo permanente, visto que as novas pragas vão requerer contínua mudança nas estratégias de controle (Zuniga e Ramirez, 2002). A família geminiviridae possui diversas espécies-tipo de vírus infectando importantes espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas causando perdas significativas para a agricultura. As espécies são transmitidas pela mosca branca *B. tabaci* de forma persistente, circulativa e infectam plantas dicotiledôneas. Epidemias de populações de *B. tabaci* são freqüentemente acompanhadas por alta incidência do gênero *Begomovírus*. Durante as duas últimas décadas, a disseminação global do biótipo B de *B. tabaci* vem sendo acompanhada pela ocorrência de geminivírus transmitidos por essa mosca branca.

Medidas de controle para conter a disseminação de geminivírus em regiões afetadas são baseadas principalmente na limitação das populações do vetor, usando barreiras químicas ou físicas. Entretanto, sob condições de ataque severo de mosca branca, nenhuma

destas medidas têm sido eficientes para prevenir a disseminação dessas viroses. A forma mais eficiente para reduzir as perdas causadas por geminivírus é o uso de variedades resistentes ou tolerantes obtidas por meio de melhoramento genético clássico ou de engenharia genética. Os *Begomovirus* têm sido intensivamente pesquisados devido aos danos causados às culturas afetadas levando a severo impacto econômico (Lapidot e Friedmann, 2002).

Dados de revisão de literatura indicam que foram encontrados 183 vírus (ou isolados) pertencentes ao gênero *Begomovirus* que podem ser transmitidos por *B. tabaci*. Verificou-se também que além da família Geminiviridae, outras duas famílias possuem gêneros de vírus que podem ser transmitidos por *B. tabaci*: a Potyviridae (3 *Ipomovirus*, 2 *Potyvirus* e 1 poty-like) e a Closteroviridae (3 *Crinivirus* e 4 *Closterovirus*). Foram encontrados ainda 2 *Carlavirus* (gênero órfão) e 1 vírus o qual não foi possível determinar a qual família e gênero pertence (Vidal *et al.*, 2000).

A importância agrícola de *B. tabaci* vem do fato de que esta espécie é atualmente uma das pragas de maior expressão econômica para a agricultura mundial e muitas das epidemias relatadas têm sido identificadas como causadas pelo polífago biótipo B, que já se encontra registrado em todos os continentes. Sua capacidade para colonizar diferentes espécies de plantas e de ser o vetor de mais de 60 diferentes fitovírus é motivo de preocupação para todas as regiões agrícolas do mundo (Secker *et al.*, 1998).

Com relação ao comportamento do biótipo B de *B. tabaci* atuar como praga, destaca-se o fato de que essa é uma espécie polífaga que se alimenta de, aproximadamente, 600 espécies de plantas pertencentes a 74 famílias botânicas diferentes, tanto monocotiledôneas quanto dicotiledôneas (Secker *et al.*, 1998). Em virtude desta característica, *B. tabaci* vem causando perdas consideráveis em várias culturas de grande importância sócio-econômica como tomate, abóbora, melão, melancia, pimentão e jiló, e em plantas ornamentais como poinsettia e crisântemo.

Até o início da década de 1960, os problemas causados por *B. tabaci* no Brasil eram de natureza variada, mais como vetor do que como praga direta. A transmissão de vírus, tais como, vírus da clorose variegada das malváceas, vírus do mosaico do abutilon, vírus do mosaico anão, vírus do mosaico dourado e vírus do mosaico das euforbiáceas, ocasionava inúmeros prejuízos. As culturas que mais sofriam perdas devido aos ataques desses vírus eram o algodão, tomate e feijão (Costa *et al.*, 1973). É provável que mudanças nas práticas agrícolas estimuladas pela “revolução verde” tenham favorecido o surgimento,

no final da década de 1960 e início da década de 1970, de surtos populacionais nos estados de São Paulo e Paraná em algodoais, tomateiros e feijoeiros (Costa, 1975).

No início da década de 1990, altas populações de *B. tabaci* foram relatadas por Melo (1992) na região de Campinas (SP), ocorrendo sobre tomate (*Lycopersicon esculentum*), detectando-se inclusive o amadurecimento irregular dos frutos. As características descritas levaram a suspeita de que o biótipo B de *B. tabaci*, até então ocorrendo em outros países das Américas, havia finalmente entrado no país. A introdução inadvertida da praga, provavelmente ocorreu por meio do trânsito internacional de passageiros ou pelo comércio internacional de plantas ornamentais ou de partes de plantas (Lima *et al.*, 1992).

Em maio de 1992, em propriedade de 12 ha cultivados em casas de vegetação no município de Holambra (SP), Lima *et al.* (1992) avaliaram moscas brancas que causavam altas infestações sobre *Chrysanthemum* spp. (cultivares “Polaris Branco”, “Rupin”, “Towt Talk”, “Super White” e “Dark Flamingo”). Estas infestações atingiam todas as fases de crescimento da planta hospedeira, fato até então não registrado no Brasil. Foi também constatada a presença de um viróide presente nas folhas das plantas, conforme relatado por Marinho e Fonseca (1992). Na oportunidade, adultos de *B. tabaci* foram coletados para determinação dos padrões eletroforéticos de isoenzimas  $\alpha$  e  $\beta$  esterases, na tentativa de encontrar marcadores moleculares que pudessem auxiliar na identificação do biótipo B agora presente no país (Lima *et al.*, 1992 e Oliveira e Lima 1997).

Em estudos realizados em 1998, adultos de *B. tabaci* foram coletados em Limoeiro do Norte (CE) e nas colônias de criação da mosca branca da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília (DF), onde observou-se que os padrões eletroforéticos eram idênticos aos da população coletada em crisântemo, proveniente da região de Campinas (SP), indicando que no período de seis anos o biótipo B havia dispersado para outras regiões do país (Oliveira *et al.*, 1998 e Lima *et al.*, 2001).

Lourenção e Nagai (1994), por volta de 1992, também observaram este biótipo no estado de São Paulo em culturas de tomate (*L. esculentum*), plantas invasoras (*Sida rhombifolia*, *Ipomoea acuminata*, *Sonchus oleraceus* e *Solanum viarum*) e plantas ornamentais (*Cucumis* spp., *Brassica* spp., *S. melongena* e *G. hirsutum*).

Uma hipótese sugerida para a dispersão do biótipo B de *B. tabaci* para várias regiões do Brasil pode ter sido, gradualmente, pela distribuição de plantas ornamentais pelo transporte rodoviário de flores. Em 1996, durante um levantamento realizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo, constatou-se a presença deste biótipo em cinco estados da

Federação: São Paulo, Bahia, Pernambuco, Ceará, Paraná e no Distrito Federal. Porém, desde então, o complexo populacional *B. tabaci* tem sido encontrado em 23 dos 26 estados da federação e no Distrito Federal (Lima *et al.*, 2001).

A grande adaptabilidade dos indivíduos de *B. tabaci* tanto a diferentes temperaturas quanto a resistência aos pesticidas pode ter sido um dos fatores que têm favorecido a disseminação dos mesmos em todo o país, principalmente na região nordeste e do semi-árido, permitindo a ocorrência deste inseto em alta densidade em várias regiões do Brasil (Oliveira *et al.*, 1998). Esse fenômeno ocorre, por exemplo, na região nordeste, que se caracteriza por apresentar clima tropical seco com estação úmida curta, alta luminosidade e calor constante. Essas são condições ideais para o plantio de diferentes tipos de culturas, permitindo que na região do semi-árido seja encontrada a maior área plantada de fruticultura do país. Em todas as áreas de cultivo dessa região, um surto populacional expressivo desse inseto foi detectado em culturas de tomate, melão, melancia, uva, algodão, entre outras. As perdas chegaram a 100 % na maioria das pequenas propriedades dos estados do Ceará e do Rio Grande do Norte. As perdas nas culturas de melão e melancia variaram entre 30 % e 100 %. Em Pernambuco, a situação tornou-se grave nas culturas de tomate, onde a praga induziu sérias desordens fitotóxicas nas plantas atacadas, como também, disseminou o geminivírus na região do vale do São Francisco, Bahia e Paraíba. Na região de Mossoró (RN), o uso excessivo de produtos químicos selecionou formas resistentes do inseto, provocando o aumento e a dispersão da mosca branca nas propriedades agrícolas locais. Em algumas dessas propriedades foi observada grande densidade populacional (em média 15 adultos/folha) da mosca branca.

Uma estratégia a esta situação seria a formação de uma linha de defesa fitossanitária ao redor do semi-árido, criando um sistema de proteção para evitar a entrada de novas pragas bem adaptadas àquele tipo de clima ou de prevenir à introdução de outras pragas ou mesmo de biótipos da mosca-branca, mais agressivas, com uma maior diversidade de hospedeiros e/ou de difícil controle (Byrne *et al.*, 1990).

Além dos danos causados em culturas de expressão econômica, soma-se o potencial da mosca branca provocar um grande impacto na cultura de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) estabelecida no Brasil. Esta cultura tem um importante papel sócio-econômico nas regiões em desenvolvimento, pois 500 milhões de pessoas nos continentes africano, asiático e americano dependem direta ou indiretamente do cultivo desta planta (Carvalho *et al.*, 2000). A produção mundial está estimada em 154 milhões de toneladas (Cereda *et al.*, 1996) sendo que, a América Latina ocupa o 3º lugar com uma produção de 32 milhões de

toneladas (Best & Henry, 1994) e o Brasil, o 1º lugar com uma produção de 25 milhões de toneladas (Cereda *et al.*, 1996). Nas últimas décadas, a mosca-branca (*B. tabaci*) tem causado grande impacto sócio-econômico atuando como vetor de fitoviroses, tendo potencial para transmitir vários tipos de vírus. O aparecimento e o estabelecimento de populações de mosca branca em áreas produtoras de mandioca têm ocorrido em virtude do trânsito de manivas de mandioca entre áreas produtoras. Isso tem causado danos na cultura de mandioca pela transmissão do vírus do mosaico africano da mandioca (ACMV). Este vírus tem causado no continente africano uma redução de 50 % na produção de mandioca (Fauquet e Fargette, 1990) com prejuízos superiores a 2 bilhões de dólares (Basu, 1995). Até o momento, este vírus não foi detectado nas culturas de mandioca brasileiras. Sendo assim, torna-se imperioso o controle e a prevenção da entrada da mosca branca, uma vez que, caso este vírus seja introduzido no Brasil, os prejuízos poderão ser elevados.

A identificação e a dispersão de *B. tabaci* presente em áreas agrícolas foram relatadas por pesquisadores em outras partes do mundo. Esse mesmo fato correu em países da Bacia do Mediterrâneo, no final da década de 1970, quando hortícolas e plantas ornamentais foram atacadas pelo inseto de forma agressiva (Traboulsi, 1994). Outros surtos populacionais de *B. tabaci* surgiram no final da década de 1980, causando grande impacto econômico, por exemplo, na região da Flórida, nos Estados Unidos da América, sobre a cultura do tomateiro quando desordens fisiológicas como o amadurecimento irregular dos frutos foi relatado. Um outro sintoma observado foi o do prateamento das folhas da aboboreira. Além desses fatores, essas populações apresentavam altos níveis de resistência aos inseticidas e transmitiam viroses desconhecidas (De Barro *et al.*, 2004).

Investigações mais elaboradas foram realizadas utilizando-se padrões de esterase e dois biótipos foram então descritos, o biótipo A, coletado sobre populações no campo e o biótipo B, sobre populações da mosca branca em casa de vegetação (Brown, 1995). Entretanto, mudanças no comportamento das duas populações indicaram uma maior agressividade do biótipo B sobre o A. O biótipo B, em um período de três anos, além de dominar as áreas de cultivo, também deslocou o biótipo A para outras regiões dos EUA (Brown *et al.*, 1992). As primeiras análises das populações de *B. tabaci* baseadas em padrões de esterases identificaram mais de 20 biótipos diferentes associados a várias plantas hospedeiras, danos agrícolas e localizações geográficas (Bedford *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 2000; Perring, 2001 e De Barro *et al.*, 2004).

Os termos raça ou biótipo apresentam o mesmo nível de distinção e são utilizados para designar populações com ausência de caracteres morfológicos adequados para

identificação, mas que possuem outras características biológicas que permitem a separação quando comparada a outras populações (Perring, 2001). A existência de biótipos distintos não é simplesmente uma questão taxonômica e sim uma influência direta da dinâmica das interações entre praga-vetor-hospedeiro (Maruthi *et al.*, 2001).

A descrição de biótipos de *B. tabaci* é um tema recorrente na descrição taxonômica dessa espécie. No final da década de 1950, Bird (1957), relatou a existência de populações de *B. tabaci* com preferência a *Jatropha* e *Sida* indicando a formação de raças ou biótipos na espécie, associado a plantas hospedeiras e transmissão de viroses. Trabalhos subseqüentes de Brown *et al.* (1995), Markham *et al.* (1995) e Perring (2001) descrevem a existência de, pelo menos, 40 biótipos diferentes. Em 2003, Simon *et al.*, descreveram um novo biótipo (denominado de T) de *B. tabaci* ocorrendo na Itália atacando *Euphorbia characias*. Mais recentemente, Delatte *et al.* (2005) descreveram um novo biótipo, denominado de Ms, ocorrendo nas ilhas do sudeste do Oceano Índico.

Um outro fato que também chamou a atenção da comunidade científica foi em relação aos comportamentos biológicos diferenciados de *B. tabaci* a diferentes plantas hospedeiras. Como exemplo, cita-se a mandioca (*Manihot esculenta*), espécie endêmica para o Brasil e que foi introduzida no continente africano. No país, a cultura da mandioca não é atacada por *B. tabaci* (Costa e Russell, 1975). Contudo, no continente africano as perdas ocasionadas pela transmissão de viroses são devastadoras (Fauquet *et al.*, 1998). Burban *et al.* (1992), observaram a presença de dois biótipos na Costa do Marfim, um que coloniza exclusivamente mandioca e outro polífago, mas que não ataca essa cultura. A espécie, também, ataca mandioca na Índia e Malásia (Basu, 1999).

De acordo com Mound (1983), as espécies quando introduzidas em novas áreas levam consigo apenas parte de seu material genético viável, podendo ser uma das explicações plausíveis para o surgimento de biótipos nas populações de *B. tabaci*. À medida que populações da mosca-branca foram sendo introduzidas em novas áreas geográficas ou diferentes locais dentro de um país, novos fatos foram relatados quanto a comportamentos mais agressivos da espécie. Diferenças entre as populações de *B. tabaci* tem sido um assunto polêmico e reconhecido como uma apresentação de vários biótipos diferentes ou simplesmente uma espécie-complexo (Brown *et al.*, 1995 e Perring, 2001).

A partir de então, amostragens intensivas têm sido realizadas em todo o mundo sobre populações de *B. tabaci*, pela expressão econômica que essa espécie representa para a agricultura mundial. Ela é considerada um dos insetos mais nocivos para os ecossistemas agrícolas e está na lista das espécies invasoras de maior impacto agro-econômico. Isso

ocorre em virtude da dificuldade em controlar as suas populações, da transmissão de viroses, das mudanças biológicas associadas a plantas hospedeiras e das condições geográficas que levam a formação de biótipos. As investigações científicas indicam que o trânsito internacional de plantas ornamentais tenha contribuído para a dispersão de diferentes populações de *B. tabaci* para o mundo.

Desde então métodos mais específicos, rápidos e seguros associados aos estudos de cruzamento entre os diferentes biótipos têm sido realizados em vários países buscando-se a identificação dos biótipos de *B. tabaci*. Esses métodos relacionam-se ao uso de marcadores moleculares baseados em DNA. Por exemplo, Gawel e Bartlett (1993), De Barro e Driver (1997), Guirao *et al.* (1997) e Lima *et al.* (1999, 2000 e 2002a) utilizaram os marcadores RAPD para diferenciar variações genéticas entre populações da mosca-branca e caracterizar os biótipos da espécie *B. tabaci*.

Além da importância dos estudos das características biológicas e genéticas soma-se, ainda, o impacto econômico ocasionado pelos biótipos de *B. tabaci*. Cada biótipo apresenta variações no grau de danos que provocam nas culturas hospedeiras. Atualmente, o biótipo que tem sido relacionado com os maiores prejuízos agrícolas refere-se ao biótipo B de *B. tabaci*. O biótipo B de *B. tabaci*, considerado o mais agressivo do mundo, tornou-se evidente quando foi introduzido nos Estados Unidos, no início da década de oitenta (Costa e Brown, 1990 e 1991; Brown *et al.*, 1992 e Perring *et al.*, 1993). Esse biótipo foi considerado bem diferente do biótipo nativo (denominado de biótipo A), sendo descrito como uma nova espécie, *Bemisia argentifolii* Bellows e Perring (Perring *et al.*, 1993 e Bellows *et al.*, 1994), cujo nome vulgar é mosca branca da folha prateada (Perring *et al.*, 1993). A designação dessa nova espécie é controversa e não é aceita pela maioria da comunidade científica. De Barro *et al.* (2004) confirmaram ser a denominação *B. argentifolii* uma forma redundante de *B. tabaci*, sugerindo que o uso da mesma não seja empregado. Atualmente, populações cosmopolitas como as do biótipo B estão presentes em praticamente todas as regiões do mundo. O tratamento a base de diferentes inseticidas selecionou novas características da praga como aumento na fecundidade e na adaptação a outros hospedeiros surgindo então os biótipos que, cada vez mais, apresentam maiores níveis de resistência a inseticidas (El-Kady *et al.*, 2002 e Byrne *et al.*, 2003).

Em se tratando desse último parâmetro, populações resistentes de mosca branca *B. tabaci* têm sido selecionadas com relação aos pesticidas convencionais, tais como, organofosforados, carbamatos, piretróides, hidrocarbonetos clorados e reguladores de crescimento de insetos (Cahill *et al.*, 1996). Uma nova classe de inseticida, os

neonicotinóides, sendo o mais proeminente dessa classe, o cloronicotinil (imidacloprid), foi a inovação no controle químico da mosca branca a partir de 1991. Esse pesticida é especialmente ativo contra hemípteros, incluindo aqueles especialmente resistentes aos demais pesticidas químicos. O imidacloprid, como os demais neonicotinóides, atua agonisticamente nos receptores nicotínicos como, por exemplo, nos receptores de acetilcolina. Esse produto é usado no tratamento de sementes e em aplicações foliares ou em solo. Em função das suas propriedades sistêmicas, ele é igualmente distribuído ao longo da planta em crescimento (Elbert *et al.*, 1998).

Resultados de monitoramento publicados em 1996 revelaram os primeiros sinais de resistência ao imidacloprid em populações de *Bemisia* na região da Almeria, no sudeste da Espanha (Cahill *et al.*, 1996 e Elbert *et al.*, 1996). Outros estudos têm mostrado que populações de mosca branca localizadas em áreas produtoras de algodão no Arizona têm se tornado menos suscetíveis ao imidacloprid no período de 1995 a 1997, quando de 1 % a 6 % da população, respectivamente, não responderam a dose de controle. Em experimentos de laboratório usando moscas brancas do biótipo B coletadas a partir de culturas comerciais de melão originárias da Califórnia, os autores observaram a seleção de populações resistentes ao imidacloprid após 24 gerações quando estas foram mantidas em um ensaio conduzido em cultura hidropônica. A natureza do mecanismo de seleção parece ser instável, provavelmente associado com desvantagens no processo de desenvolvimento do inseto, uma vez que, quando a pressão fora removida, a linhagem de característica resistente fora revertida após poucas gerações (Elbert e Nauen, 2000).

Trabalhos de Morin *et al.* (2002) mostraram que no biótipo B a resistência estava associada com a mutação L925I (substituição de uma leucina por uma isoleucina na posição 925) no *para*-tipo no canal de voltagem de sódio. Alon *et al.* (2006) realizaram estudos com os dois principais biótipos, B e Q, que são causadores de consideráveis perdas na produção agrícola e que apresentam distribuição simpátrica no Mediterrâneo. Estes dois biótipos se caracterizam por apresentarem altos níveis de resistência a piretróides quando potencializados por organofosforados. Os autores identificaram no biótipo Q duas mutações no *para*-tipo no canal de voltagem de sódio associadas com a resistência a piretróides potencializados por organofosforados. A primeira mutação foi a L925I que ocorre no biótipo B e, a segunda, a substituição da treonina por valina na posição 929 (T929V). Para determinar se essas duas mutações tinham origens simples ou múltiplas, foram seqüenciadas as regiões do DNA que flanqueavam essas mutações em 13 linhagens dos biótipos B e Q de ocorrência ao redor do mundo. Os estudos revelaram cinco alelos

resistentes e cinco alelos suscetíveis. No caso dos alelos resistentes a diversidade de nucleotídeos era menor dentro dos biótipos e maior entre estes. Com relação à diversidade de nucleotídeos nos alelos suscetíveis, esta foi maior entre os dois biótipos. Essas informações foram consistentes com origens múltiplas independentes para o processo de resistência. Embora os biótipos B e Q coexistam em várias regiões do Mediterrâneo, a divergência nas seqüências de DNA entre os dois biótipos no *locus* do *para*-tipo do canal de voltagem de sódio sugere que o fluxo gênico entre estes dois biótipos é baixo ou nulo.

Horowitz *et al.* (2005) realizaram o monitoramento de populações de *B. tabaci* de ambos os biótipos, B e Q, ocorrendo em culturas comerciais de algodão em duas regiões de Israel com relação à aplicação do inseticida pyriproxyfen no período de 1996 a 2003. O uso desse inseticida foi suspenso nessas duas áreas no período de 1996-1997 em função da descrição de casos de resistência em populações de mosca branca ocorrendo nas referidas áreas. Os autores observaram que com a suspensão do inseticida, houve um declínio no nível de resistência das populações. Contudo, a susceptibilidade não foi restaurada completamente nas populações de *B. tabaci*. Dessa forma, duas populações coletadas nos anos de 1999 e 2002 em áreas onde havia a aplicação de inseticida foram testadas com relação às suas susceptibilidades ao pyriproxyfen na geração F1 e, subseqüentemente, uma geração de cada uma dessas populações foi mantida em condições controladas sem exposição ao inseticida. Após a manutenção por mais de 20 gerações em condições controladas, a resistência ao inseticida nessas duas populações reduziu substancialmente. Esse declínio era concorrente com a substituição do biótipo Q pelo biótipo B em regimes sem presença de inseticidas. Os autores concluíram que, aparentemente, o biótipo B era mais competitivo do que o biótipo Q resistente ao pyriproxyfen. A seleção sob condições controladas com neonicotinóides das populações do biótipo B resultou em níveis continuados de resistência ao inseticida, predominantemente em relação ao biótipo Q. Baseado nesses dados, os autores concluíram que aplicações tanto do inseticida pyriproxyfen ou de neonicotinóides poderiam selecionar para o biótipo Q que poderia sobreviver quando presente em áreas onde ocorrem aplicações de inseticidas.

Muito embora o impacto socioeconômico efetivamente causado pelo complexo *B. tabaci* na agricultura mundial seja de difícil mensuração e, por isso mesmo indisponível nas publicações científicas, estima-se que nas últimas três décadas as perdas e os custos de controle provocados pelo inseto foram da ordem de bilhões de dólares. Sob condições ideais de temperatura e umidade relativa do ar, uma população capaz de produzir graves danos à produção pode surgir em três semanas. Características comuns encontradas em

praticamente todas as regiões nas quais houve um ataque intensivo de populações desta espécie foram práticas agrícolas intensivas com sobreposição de estações de cultivo e clima árido e quente, associado a uma espécie com grande potencial biótico de adaptação a inúmeros ambientes (Toscano *et al.*, 1998), plantas hospedeiras adequadas e ambientes apresentando estresse provocado por agrotóxicos (Gerling, 2002).

O impacto da alimentação direta e da excreção da substância açucarada em todos os estágios da mosca branca leva à redução de qualidade e quantidade de produção, em todas as culturas atacadas pela praga. Em frutas, plantas ornamentais e na cultura do algodoeiro, por exemplo, o impacto da alimentação direta e a excreção de açúcares favorecem o aparecimento de fumagina. A fumagina é causada pelo desenvolvimento de fungos saprófitas sobre a excreção açucarada, deixando os produtos inadequados para comercialização pela depreciação estética e, no caso específico do algodão, com fios pegajosos que desgastam as máquinas nas indústrias têxteis (Ellsworth *et al.*, 1999).

Atualmente, *B. tabaci* biótipo B é presença constante em todos os continentes. A maior causa dessa dispersão se deve ao transporte e introdução de plantas ornamentais nos diversos países. Na Europa, a grande massa populacional da praga está concentrada no meio leste e presente até mesmo nas horticulturas protegidas do Norte da Europa. Um biótipo bem próximo ao B, o B2, presente no Iêmen, destrói plantações inteiras de melancia, tomate e tabaco, ocasionando prejuízos da ordem de milhões de dólares anuais (Bedford *et al.*, 1994). Recentemente, sua presença foi detectada ao norte da Índia, acarretando danos em plantações de tomate, com a transmissão do vírus TLCV (Tomato leaf curl virus) (Banks *et al.*, 2001).

Desde 1991, no sul dos Estados Unidos, as perdas vêm ultrapassando a faixa de US\$ 500 milhões de dólares, apenas em relação às culturas de inverno além dos prejuízos causados como praga e vetor no restante do país (Perring *et al.*, 1993 e Perring, 2001). O Vale Imperial da Califórnia sentiu os efeitos destrutivos do inseto no início da década de 1990, já que as perdas estimadas em 1991 e 1992 no Arizona, Califórnia, Texas e Flórida, variaram de US\$ 200 a 500 milhões (Henneberry *et al.*, 1996 e 2000). No período entre 1991 a 1995, as perdas anuais no Vale Imperial foram superiores a US\$ 100 milhões (Henneberry *et al.*, 1996 e 2000). Entre 1994 a 1998, produtores de algodão do Arizona, Califórnia e Texas gastaram, aproximadamente, US\$ 153,9 milhões para o controle de *B. tabaci* e prevenção do sintoma de liga pegajosa dos fios do algodão provocado pela substância açucarada eliminada pelo inseto (Ellsworth *et al.*, 1999). Desde 1981 que *B. tabaci* foi reconhecida como praga de expressão econômica de algodão na Baixa

Califórnia, México (Medina-Esparza e Leon-Paul, 1994). Contudo, os outonos de 1991 e 1992 também foram críticos para outras regiões nesse país, quando as perdas causadas por *B. tabaci* excederam US\$ 33 milhões nas culturas do algodão, melão, melancia e gergelim. A produção de algodão foi reduzida de 39.415 ha em 1991 para somente 653 ha em 1992. Os plantios de algodão, na região de Sonora, comparando-se os anos de 1995 e 1996, nesse último, as perdas atingiram 65 % da produção (Silva-Sanchez, 1997).

O biótipo B também é predominante, tanto como praga quanto vetor, em El Salvador, Honduras, Nicarágua, Costa Rica, Panamá e Cuba, somando prejuízos acima de US\$ 100 milhões de dólares em culturas como feijão, melão, pepino e principalmente tomate. As perdas chegam até 100 % nas pequenas propriedades, ocasionando desemprego e falência de algumas empresas de pequeno porte (Chang, 2000; Chicas e Cervantes, 2000; Hilje *et al.*, 2000; Sediles, 2000; Vasquez *et al.*, 2000 e Morales e Anderson, 2001).

Na Colômbia a existência dos biótipos A e B de *B. tabaci* é um fato muito problemático. As culturas mais afetadas nas regiões costeiras são algodão, tomate, melão e berinjela; já, no interior do país, as culturas mais afetadas são tabaco, melão e ornamentais. A distribuição do biótipo A está relacionada às culturas plantadas nas regiões mais centrais do país. Os prejuízos ainda são muitos (perdas de 50 % a 80 % da safra) mas, com algumas medidas preventivas, os produtores conseguem conviver com os problemas causados pela mosca branca (González e López-Ávila, 2000 e Morales e Anderson, 2001).

No Chile, *B. tabaci* foi encontrada pela primeira vez em 1998, em plantas de alfafa provenientes dos EUA. Estas plantas logo receberam tratamento e o foco foi erradicado. Em 1999, foi novamente detectada em viveiros de *Hibiscus* e *Euphorbia* no extremo norte do país, nas áreas rurais e urbanas e também em parques públicos. Desde esse período, a situação não tem sido fácil para os produtores, principalmente nas zonas mais produtivas, com os cultivos de tomate, cucurbitáceas, brócolis e alface. Até aquele momento se desconheciam os biótipos presentes no país (SAG, 1999 e 2000).

O Brasil sentiu os efeitos provocados pela presença do biótipo B de *B. tabaci* a partir de 1995. Este inseto tem causado grandes prejuízos nos ecossistemas agrícolas, semelhantemente aos problemas socioeconômicos provocados pela entrada do bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis*, na região Nordeste, na década de 80. Perdas e danos diretos e indiretos, associados às reduções quantitativas e qualitativas na produção, além da redução de empregos no campo, podem exceder vários bilhões de dólares. As principais culturas atacadas têm sido *P. vulgaris*, *L. esculentum*, *G. hirsutum*, *C. melo*, *C. lunatus*, *Cucumis anguria*, *Cucumis sativa*, *Capsicum* spp., *G. max*, *C. pepo*, *Brassica oleracea*,

*Brassica oleracea* var. *capitata*, *Brassica oleracea* var. *italica*, *Brassica oleracea* var. *botrytis*, *Solanum gilo*, *Passiflora* spp., *H. esculentus*, *E. pulcherrima* e *Chrysanthemum* spp. (Oliveira *et al.*, 1998 e 2001).

A importância econômica da mosca branca como praga está se expandindo em todo o mundo, inclusive no Brasil, principalmente como vetor de fitovirose. Embora as moscas brancas sejam consideradas insetos tropicais, atualmente elas podem ser encontradas em quase todas as regiões do mundo, sendo muito resistentes a variações de temperatura e aos inseticidas. A grande adaptabilidade dos indivíduos dessas espécies favorece o aparecimento de biótipos entre as populações e aumento do espectro de plantas hospedeiras. Recentemente, a tecnologia molecular forneceu instrumentos valiosos para a investigação de marcadores moleculares presentes nas populações naturais, dando o esclarecimento necessário sobre o comportamento e a dinâmica das populações, no seu contexto ecológico. Assim, o conhecimento da diferenciação genética da *B. tabaci* no Brasil, envolvendo populações de diferentes plantas hospedeiras, de diferentes regiões geográficas e possivelmente ocorrência de variações genéticas dentro de populações, terão implicações importantes para as estratégias de controle da mosca branca no Brasil.

## **OBJETIVO GERAL**

Caracterizar e analisar a variabilidade genética da mosca branca *Bemisia tabaci* por meio de marcadores moleculares baseados em DNA.

## **HIPÓTESE**

Marcadores moleculares baseados em RAPD podem ser utilizados na identificação e caracterização genética, como também, no desenvolvimento de marcadores específicos de DNA para a detecção dos diferentes biótipos de *Bemisia tabaci*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alon, M., Benting, J., Lueke, B., Ponge, T., Alon, F. and Morin, S. (2006). Multiple origins of pyrethroid resistance in sympatric biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 36, 71-79.

Banks, G. K., Colvin, J., Chowda, R. V., Maruthi, M. N., Muniyappa, V., Venkatesh, H. M., Kiran Kumar, M., Padma, A. S., Beitia, F. J. E Seal, S. E. (2001). First report of the *Bemisia tabaci* B biotype in India and an associated tomato leaf curl virus disease epidemic. **Plant Disease**, 2 (85), 231-235.

Basu, A. N. (1995). *Bemisia tabaci* (Gennadius): crop protection and principal whitefly vector of plant viruses. New Delhi: Westview Press. 183p.

Basu, A. N. (1999). *Bemisia tabaci* (Gennadius): crop protection and principal whitefly vector of plant viruses. New Delhi: Westview Press. 183p.

Bedford, I., Briddon, R. W., Brown, J. K., Rosell, R. C. e Markham, P. G. (1994). Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. **Annals of Applied Biology**, 125, 311-325.

Bellows, T. S. J. R., Perring, T. M., Gill, R. J. e Hendrick, D. H. (1994). Description of a species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). **Annals of the Entomological Society of America**, 87, 195-206.

Best, R. e Henry, G. (1994). Cassava: towards the year 2000. In: International Network for Cassava Genetic Resources. Report of the First Meeting of the International Network for Cassava Genetic Resources, CIAT, CALI, Colombia, 18-23 August 1992. International Crop Network Series No. 10. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. Pp.3-11.

Bird, J. (1957). White-fly transmitted mosaic of *Jatropha gossypifolia*. **Agriculture Experimental Station University of Porto Rico**, 22, 1-35.

Brown, J. K., Coats, S., Bedford, J. D., Markham, P. G. e Bird, J. (1992). Biotypic characterization of *Bemisia tabaci* populations based on esterase profiles, DNA fingerprinting, virus transmission, and bioassay to key host plant species. **Phytopathology**, 82, 1104.

Brown, J. K. e Bird, J. (1992). Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean basin: past and present. **Plant Disease**, 76, 220–225.

Brown, J. K., Frohlich, D. R. e Rosell, R. C. (1995). The sweetpotato a silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a new species complex? **Annual Review of Entomology**, 40, 511-534.

Brown, J. K. e Bird, J. (1995). Variability within the *Bemisia tabaci* species complex and its relation to new epidemics caused by geminiviruses. **CEIBA**, 36, 73-80.

Brown, J. K., Idris, A. M., Olsen, M. W., Miller, M. E., Isakeit, T. e Anciso, J. (2000). Cucurbit leaf curl virus, a new whitefly transmitted geminivirus in Arizona, Texas, and Mexico. **Plant Disease**, 84 (7), 809.

Byrne, D. N., Bellows, Jr., T. S. e Parrella, M. P. (1990). Whiteflies in agricultural systems. In: Whiteflies: their bionomics, pest status and management. Ed. D. Gerling. Wimborne, UK: Intercept, Andover. Pp. 227-261.

Byrne, D. N. e Bellows, T. S. (1991). Whitefly biology. **Annu. Rev. Entomol.** 36, 431-457.

Byrne, F. J., Castle, S., Prabhaker, N. e Toscano, N. C. (2003). Biochemical study of resistance to imidacloprid in B biotype *Bemisia tabaci* from Guatemala. **Pest Management Science**, 3 (59), 347-352.

Burban, C., Fishpool, L. D. C., Fauquet, C., Fargette, D. e Thouvenel, J. –C. (1992). Host-associated biotypes within West African populations of the whitefly *Bemisia tabaci* (Genn.). (Hom., Aleyrodidae). **J. Appl. Ent.**, 113, 416-423.

Cahill, M., Denholm, I., Byrne, F. J. e Devonshire, A. L. (1996). Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* – current status and implications for management. **Proceedings of Brighton Crop Protection Conference – Pests and Diseases**, I, 75-80.

Cahill, M., Gorman, K., Day, S., Denholm, I., Elbert, A. e Nauen, R. (1996). Baseline determination and detection of resistance to imidacloprid in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). **Bulletin of Entomological Research**, 86, 343-349.

Carvalho, L. J. C. B., Cabral, G. & Campos, L. (2000). Raiz de reserva de mandioca: um sistema biológico de múltipla utilidade. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, **Documentos**, 44, 16p.

Cereda, M. P., Takitane, I. C., Chuzel, G. e Vilpoux, O. (1996). Starch potencial in Brazil. In: Cassava Flour and Starch: Progress in Research and Development. Eds. Dufour, D., O'Brien, G. M. Best, R., Montpellier, France: Centre de Cooopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Département des Systèmes Agroalimentaires et Ruraux; Cali, colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, pp. 19-29.

Chang, R. (2000). Informe de Panamá. In: INFORMES NACIONALES, 2000. Panama. Anais... Panama: Luko Hilje. p. 26-28.

Chicas, J. M. S. e Cervantes, L. S. (2000). Informe de El Salvador. In: INFORMES NACIONALES, 2000. Panama. Anais... Panama: Luko Hilje. p.10-17.

Costa, H. S. e Brown, J. K. (1990). Variability in biological characteristics, isozyme patterns and virus transmission among populations of *Bemisia tabaci* in Arizona. **Phytopathology**, 80, 888-893.

Costa, H. S. e Brown, J. K. (1991). Variation in biological characteristics and esterase patterns among populations of *Bemisia tabaci*, and the association of one population with silverleaf symptom induction. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 61, 211-219.

Costa, A. S., Costa, C. L. e Sauer, H. F. (1973). Surto de mosca-branca em culturas do Paraná e São Paulo. Anais Sociedade Entomológica do Brasil. CEPEC, Itabuna, Brasil, 2 (1), 20-30.

Costa, A. S. e Russell, L. M. (1975). Failure of *Bemisia tabaci* to breed on cassava plants in Brazil (Homoptera: Aleyrodidae). **Ciência e Cultura São Paulo**, 27, 388-390.

Dávila, A. G. H. (1999). La mosca blanca (Homoptera: Aleyrodidae) en Guatemala. In: VII Taller Latinoamericano y del Caribe Sobre Moscas-Blancas y Geminivirus. Anais...IPA, Recife, PE, Brazil. p. 125-126.

De Barro, P. J. e Driver, F. (1997). Use of RAPD-PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). **Australian Journal of Entomology**, 36, 149-152.

De Barro, P. J., Trueman, J. W. H. e Frohlich, D. R. *Bemisia argentifolii* is a population of *B. tabaci*: the molecular genetic differentiation of *B. tabaci* populations around the world. (mensagem pessoal) Mensagem recebida por [luzia@cenargen.embrapa.br](mailto:luzia@cenargen.embrapa.br) em 04 março de 2004.

Delatte, H., Reynaud, B., Granier, M., Thornary, L., Lett, J. M., Goldbach, R. e Peterschmitt, M. A. (2005). New silverleaf-inducing biotype Ms of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) indigenous to the islands of the south-west Indian Ocean. **Bulletin of Entomological Research**, 95, 29-35.

Elbert, A., Nauen, R., Cahill, M., Devonshire, A. L., Scarr, A. W., Sone, S. and Steffens, R. (1996). Resistance management with chloronicotynil insecticides using imidacloprid as an example. **Pflanzenschutz Nachrichten Bayer**, 49, 5-54.

Elbert, A. e Nauen, R. (2000). Resistance of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides in southern Spain with special reference to neonicotinoids. **Pest Management Science**, 56, 60-64.

Elbert, A., Nauen, R e Leicht, W. (1998). Imidacloprid, a novel chloronicotinil insecticide: biological activity and agricultural importance. In: Insecticides with Novel Modes of Action, Mechanism and Application. In: ISHAAYA, I. E DEGHEELE, D. (Eds.). Springer Verlag, 50-73.

Ellsworth, P. C., Tronstad, R., Leser, J., Goodell, P. B., Godfrey, L. D., Henneberry, T. J., Hendrix, D., Brushwood D., Naranjo, S. E., Castle, S. e Nichols, R. L. (1999). Stick cotton sources and solutions. The University of Arizona, Cooperative Extension. **IPM Series**, 13 (1156-12), 1- 4.

El-Kady, H., Denholm, I. e Devine, G. J. (2002). Insecticide resistance in Egyptian strains of *Bemisia tabaci*. The BCPC Conference: Pests and Diseases, 1-2, 787-792.

EWSN. European Whitefly Studies Network. Disponível em: <http://www.whitefly.org>. Acesso em 07 de fevereiro de 2004 (informações extraídas das edições de 1999).

EWSN. European Whitefly Studies Network. Disponível em: <http://www.whitefly.org>. Acesso em 07 de fevereiro de 2004. (informações extraídas das edições de 2000).

Fauquet, C. e Fargette, D. (1990). African cassava mosaic virus: etiology, epidemiology, and control. **Plant disease**, 74, 404-411.

Fauquet, C. M., Pita, J., Deng, D., Tores-Jerez, I., Otim-Nape, W. G., Ogwal, S., Sangare, A., Beachy, R. N. e Brown, J. K. (1998). The east african cassava mosaic virus epidemic in Uganda. International Workshop on *Bemisia* and Geminiviruses. San Juan, Puerto Rico, June 7-12, L-4.

Gawel, N. J. e Bartlett, A. C. (1993). Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. **Insect Molecular Biology**, 2 (1), 33-38.

Gennadius, P. (1889). Disease of tobacco plantations in the Trikonía. The aleurodid of tobacco. **Ellenike Georgia**, 5, 1-3 (publicação em grego).

Gerling, D. (2002). Whiteflies revisited. **Manejo Integrado de Plagas**, 63, 13-21.

González, J. G. e López-Ávila, A. (2000). Informe de Colombia. In: INFORMES NACIONALES, 2000. Panamá. Anais... Panamá: Luko Hilje. p. 40-46.

Guirao, P., Beitia, F. e Cenis, J. L. (1997). Biotype determination of Spanish populations of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). **Bulletin of Entomological Research**, 87, 587-593.

Henneberry, T. J., Toscano, N. C. e Castle, S. J. (1996). *Bemisia* spp. (Homoptera: Aleyrodidae) in the United States: History, pest status and management. **Recent Research Development in Entomology**, 2, 151-161.

Henneberry, T. J., Jones, W. A. e Faust, R. M. (2000). Brief industry, research progress and current pest status of *Bemisia* in the United States. In: HENNEBERRY, T. J.; FAUST, R. M.; JONES, W. A.; PERRING, T. M. (Eds.). Silverleaf Whitefly National Research, Action and Technology Transfer Plan. Third Annual Review of the Second 5-Year Plan. U.S. Department of Agriculture, p. 1-2.

Hilje, L., Ramírez, P. e Sibaja, G. (2000). Informe de Costa Rica. In: INFORMES NACIONALES, 2000. Panamá. Anais... Panamá: Luko Hilje. p. 21-25.

Horowitz, A. R., Kontsedalov, S., Khasdan, V. e Ishaaya, I. (2005). Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 58, 216-225.

Lapidot, M. e Friedmann, M. (2002). Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. **Annals of Applied Biology**, 140 (2), 109-127.

Lima, L. H. C., Oliveira, M. R. V., Gomes, A. C. M. M.e Ferreira, D. N. M. (1992). Análise eletroforética em populações da mosca branca, *Trialeurodes vaporariorum* e *Bemisia* sp. (Homoptera, Aleyrodidae). **Pesquisa em Andamento**, 5, 1-5.

Lima, L. H. C.; Campos, L.; Moretzsohn, M. C.; Ferreira D. N. M; Ribeiro E Silva, O.L. & Oliveira, M.R.V. (1999). Populações de *Bemisia tabaci* (Gennadius) raça B no Brasil: análise da diversidade genética por RAPD. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Pesquisa em Andamento**, 22.

Lima, L .H. C., Návia, D., Inglis, P .W. e Oliveira, M. R. V. (2000). Survey of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera:Aleyrodidae) biotypes in Brazil using RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, 4 (23), 1-5.

Lima, L. H. C., Moretzsohn, M. C., Queiroz, P. R., Lago, W. N. M. e Oliveira, M. R. V. (2001). Monitoramento e identificação de aleirodídeos por meios morfológicos e de marcadores RAPD. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Documentos**, 17.

Lima, L. H. C., Campos, L., Moretzsohn, M. C., Návia D. e Oliveira, M. R. V. (2002a). Genetic Diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) Populations in Brazil Revealed by RAPD Markers. **Genetics and Molecular Biology**, 2 (25), 217-223.

Lourenção, A. L. e Nagai, H. (1994). Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. **Bragantia**, 53 (1), 53-59.

Marinho, V. L. A. e Fonseca, M. E. N. (1992). Ocorrência de RNA do tipo viróide em plantas de crisântemo proveniente do estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, 17 (2), p.179.

Markham, P., Bedford, J. D., Liu, S., Frolich, D. F., Rossel, R. e Brown, J. K. (1996). The transmission of geminiviruses by biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius). In: Gerling D.;

Mayer R. T. (Eds.) *Bemisia* 1995: Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management. Intercept, Andover, Hants, UK., pp. 69-75.

Mathurin, G. (1994). Integrated Pest Management in St. Lucia. Seminar Proceedings, Setting up an Integrated Pest Management Network for the Caribbean, Anais... Barbados, 16-19 October. p. 47-53.

Maruthi, M. N.; Colvin, J.; Seal, S. (2001). Mating compatibility, life-history traits, and RAPD-PCR variation in *Bemisia tabaci* associated with the cassava mosaic disease pandemic in East Africa. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 99 (1), 13-23.

Medina Esparza, J. J.; Leon-Paul, R. L. (1994). Evaluation of pesticides for the control of whitefly on cotton. INIFAP-CIRNO-CEMEXI, Mexicali Valley - 1993. Proc. International Pest Work Committee, Mazatlan, Mexico. Anais...California Department of Food and Agriculture, Sacramento, CA. p.50-55.

Morales, F. J. e Anderson, P. K. (2001). The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. **Archives of Virology**, 146, 415-441.

Morin, S., Williamson, M. S., Goodson, S. J., Brown, J. K., Tabashnik, B. E. e Dennehy, T. J. (2002). Mutations in the *Bemisia tabaci para* sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 32, 1781-1791.

Mound, L. A., and Halsey, S. H. (1978). Whitefly of the world. A systematic catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with host plant and natural enemy data. New York: Wiley. 340p.

Mound, L. A. (1983). Biology and identity of whitefly vectors of plant pathogens. In: Plant virus epidemiology (ed. Plumb, R. T. e Thresh, J. M.). Oxford: Blackwell Scientific, 305-313 pp.

Munroet, L. A. (1994). Integrated Pest Management in Guyana. Seminar Proceedings, Setting up an Integrated Pest Management Network for the Caribbean, Anais... Barbados, 16-19 October. p.47-53.

Oliveira, M. R. V. e Lima, L. H. C. (1997). Padrões isoenzimáticos de *Trialeurodes vaporariorum* e de *Bemisia tabaci* (Homoptera, Aphelinidae). **Pesquisa agropecuária brasileira**, 32 (7), 683-687.

Oliveira, M. R. V., Lima, L. H. e Ferreira, L. T. (1997). Análise eletroforética de populações da mosca-branca, *Bemisia tabaci* raça B (= *B. argentifolii*) (Homoptera, Aleyrodidae). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. **Pesquisa em andamento**, 11, 1 –6.

Oliveira, M. R. V. de., Lima, L. H. C., Ferreira, D. M. N. e Vieira, P. R. G. (1998). Avaliação das populações de *Bemisia tabaci* (Gennadius) por meio de RAPD-PCR, no Brasil. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Pesquisa em Andamento**, 18, 6p.

Oliveira, M. R. V. (2001). Mosca-branca, *Bemisia tabaci* raça B (Hemiptera: Aleyrodidae). In: Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil. Eds.: E. F. Vilela; R. A. Zucchi; F. Cantor. Ribeirão Preto: Holos. p.61-71.

Pantoja, A. e Cabrera, I. (2000). Informe de Puerto Rico. In: INFORMES NACIONALES, 2000. Panama. Anais... Panama: Luko Hilje. p.37-39.

Perring, T. M. (2001). The *Bemisia tabaci* species complex. **Crop Protection**, 20 (9), 725-737.

Perring, T. M., Cooper, A. D., Rodriguez, R. J., Farrar, C. A. e Bellows, Jr. T. S. (1993). Identification of a whitefly species by genomic and behavioural studies. **Science**, 259, 74-77.

Polston, J. E. e Anderson, P. K. (1997). The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. **Plant Disease**, 81 (12), 1358-1369.

Russell, L. M. (1957). Synonyms of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera, Aleyrodidae). **Bulletin Brooklyn Entomological Society**, 52, 122-123.

SAG. (1999-2000). Prospección de moscas blancas en la Zona Central de Chile. Documento Interno. Chile: SAG. 70p.

SALAS, J. e ARNAL, E. (2001). *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1899) biotype B, first record for Venezuela using RAPD's-PCR. **Entomotropica**, 3 (16), 181-185.

Secker, A. E., Bedford, I. D., Markham, P. G., Williams, M. E. C. De. (1998). Squash, a reliable field indicator for the presence of the B biotype of tobacco whitefly, *Bemisia tabaci*. Brighton Crop Protection Conference: Pests & Diseases - 1998: Volume 3: Proceedings of an International Conference, Brighton, UK, 16-19 November 1998, p.837-842.

Sediles, A. (2000). Informe de Nicaragua. In: INFORMES NACIONALES, 2000. Panama. Anais... Panama: Luko Hilje. p.18-20.

Silva Sanchez, C. (1997). Behavior of the silverleaf whitefly (*Bemisia argentifolii* B&P) in the cotton crop on the coast of Hermosillo, Sonora, p. 34. Annals... Proceedings International Cotton Pest Work Committee, Mazatlan, Mexico. California Dept. Food and Agric., Sacramento, CA.

Simon, B., Cenis, J. L., Demichelis, S., Rapisarda, C., Caciagli, P. e Bosco, D. (2003). Survey of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) biotypes in Italy with the description of a new biotype (T) from *Euphorbia characias*. **Bulletin of Entomological Research**, 3 (93), 259-264.

Takahashi, R. (1936). Some Aleyrodidae from Japan. **Insecta Matsum**, 21, 12-21.

Toscano, N. C., Castle, S. J., Henneberry, T. J. e Prabhaker, N. (1998). Invasions by *Bemisia* and its exploitation if agricultural systems. Annals... International Workshop on *Bemisia* and Geminiviruses. San Juan, Puerto Rico. L-6, June 7-12.

Traboulsi, R. (1994). *Bemisia tabaci*: a report on its pest status with particular reference to the Near East. **FAO Plant Protection Bulletin**, 42(1-2), 58.

Valarezo, O. e López, M. A. (2000). Informe de Ecuador. In: INFORMES NACIONALES, 2000. Panama. Anais... Panama: Luko Hilje. p.59-61.

Valencia, L. V., Mujica, N. e Cisneros, F. (2000). Informe de Peru. In: INFORMES NACIONALES, 2000. Panama. Anais... Panama: Luko Hilje. p.62-68.

Vazquez, L. L. V. (1999). Mosca blanca-geminivirus en el Caribe: estado actual y perspectivas. VIII Taller Latinoamericano y Del Caribe sobre moscas blancas y geminivirus. Anais... 17-20 de Outubro. p.45-58.

Vázquez, L. L., Gómez, O., González, G., Madelaine, Q. (2000). Informe de Cuba. In: INFORMES NACIONALES, 2000. Panama. Anais... Panama: Luko Hilje. p.29-32.

Vidal, C. A., Nascimento, A. S., Barbosa, C. J., Marques, O. M. e Habibe, T. C. (2000). Experimental transmission of “sticky disease” of papaya by *Bemisia argentifolli* Bellows & Perring. Abstract book II - XXI International Congress of Entomology, Brazil, August p.20-26.

Villar, A., Alvarez, P., Escarramán, V. e Gómez, E. (2000). Informe de La Republica Dominicana. In: INFORMES NACIONALES, 2000. Panama. Anais... Panama: Luko Hilje. p.33-36.

Villas Bôas, G. L., França, F. H., Ávila, A. C. e Bezerra, I. C. (1997). Manejo integrado da mosca branca *Bemisia argentifolii*. **Circular técnica da Embrapa hortaliças**, 9, 11p.

Zuniga, V. E. e Ramirez, P. (2002). Geminivirus, pathogens of worldwide importance. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecologia**, 64, 25-33.

# CAPÍTULO 1

## Identificação molecular e análise da variabilidade genética da mosca branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae)

*“Há duas formas para viver a sua vida:*

*Uma é acreditar que não existe milagre.*

*A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre”.*

*Albert Einstein (1879-1955).*

### RESUMO

Com a caracterização é possível discriminar as diversas espécies de insetos fornecendo suporte na identificação e na análise filogenética de gêneros e espécies relacionadas. Além disso, os marcadores moleculares podem ser empregados em estudos complementares de caracterização de organismos. Várias estratégias moleculares têm sido aplicadas nos estudos dos biótipos de *B. tabaci*, buscando-se a identificação e o desenvolvimento de marcadores específicos para a caracterização de populações naturais, permitindo o seu uso em associação a estudos de identificação de biótipos, no estabelecimento de relações filogenéticas entre diferentes populações de um mesmo biótipo, no monitoramento e na interceptação de amostras infestadas por meio de métodos mais eficientes, precisos e de maior sensibilidade de detecção. Marcadores de RAPD foram utilizados no estudo dos biótipos de *B. tabaci* e outras espécies de insetos, possibilitando identificar populações de *B. tabaci* coletadas em várias culturas, analisar a dispersão das populações de mosca branca, caracterizar as populações do biótipo B de *B. tabaci* coletadas em várias culturas no Brasil e realizar um estudo comparativo do perfil molecular de *B. tabaci* e outras espécies de insetos. Os resultados observados nas análises moleculares apontam para um comportamento complexo da mosca branca em campo. Dessa forma, uma resposta mais adequada para se avaliar o padrão da mosca branca deve agrupar muitas variáveis, desde a estratégia reprodutiva da espécie até outros parâmetros, entre eles, comportamentais, ambientais e biológicos. Os resultados indicaram também a possibilidade de seleção de determinadas bandas de DNA, geradas por RAPD e específicas para cada espécie, para o desenvolvimento de *kits* para a identificação das mesmas. Essa

estratégia é particularmente importante para estudos envolvendo os biótipos de *B. tabaci*, uma vez que, cada biótipo apresenta características peculiares e a sua introdução em determinadas regiões do mundo se constitui em risco quarentenário. A partir desse ponto, esses dados poderão resultar em informações valiosas para a elaboração de estratégias de controle mais eficientes e servir de referência para a elaboração de medidas fitossanitárias mais efetivas contra essa espécie de aleirodídeo.

## INTRODUÇÃO

O levantamento qualitativo e quantitativo de caracteres relacionados a um dado organismo permite a sua caracterização. Dessa forma, com a caracterização é possível discriminar as diversas espécies de insetos por meio do conhecimento de seus padrões fisiológicos, morfológicos e genéticos. Neste contexto, a caracterização também auxilia no processo de identificação, quando a espécie não está bem definida (Frutos *et al.*, 1994). O conhecimento de cada um destes aspectos são complementares e definem cada organismo. Quanto mais detalhados forem os conhecimentos sobre um organismo, maior será a chance de realizar a sua identificação. A análise de várias características fornece suporte para resolver questões geradas pela sistemática clássica na identificação de espécies, assim como permite a análise filogenética de gêneros e espécies relacionadas (Sosa-Gómez *et al.*, 1998).

Dessa forma, os marcadores moleculares, então, são ferramentas complementares para os estudos de caracterização de organismos. O marcador molecular representa todo e qualquer fenótipo de um gene expresso, como no caso das isoenzimas, ou de um segmento do DNA que corresponde a regiões, expressas ou não, do genoma. (Ferreira & Grattapaglia, 1995). O desenvolvimento da Biologia Molecular permitiu o surgimento de diversos métodos de detecção de polimorfismo genético, tanto bioquímico quanto de ácido nucleico. As principais vantagens do uso dos marcadores moleculares baseados em DNA são: 1) a análise de um grande número de *locus*; 2) a neutralidade em relação a efeitos fenotípicos (efeito epistático ou pleiotrópico mínimo ou nulo); 3) a co-dominância, com maior quantidade de informação genética por *locus*; 4) a caracterização do genótipo de um indivíduo a partir de amostras de células ou tecidos.

Essas propriedades podem então ser aplicadas ao estudo da mosca branca em virtude dos problemas causados por esse inseto. Uma alternativa é a prevenção por meio da

identificação rápida do inseto na planta hospedeira, em áreas locais ou em campo. A identificação da mosca branca foi feita inicialmente por meio de caracteres morfológicos da pupa. Contudo, esses critérios podem levar a uma identificação incompleta ou até mesmo errônea do indivíduo se forem consideradas isoladamente. Além disso, a identificação a partir de adultos de algumas espécies de mosca branca é particularmente difícil, pois estas compartilham características morfológicas semelhantes (Wool *et al.*, 1989). Essa característica também se aplica aos biótipos de *B. tabaci* que apresentam uma elevada semelhança morfológica, dificultando a identificação e a individualização dos seus vários biótipos.

Sendo assim, houve a necessidade de se estabelecer métodos mais precisos para a identificação e a caracterização dos biótipos de *B. tabaci*. Inicialmente, Wool *et al.* (1989) usando os padrões de esterase e  $\alpha$ -glicerofosfato desidrogenase conseguiram diferenciar populações de *B. tabaci* de outras espécies de aleirodídeos, tais como, *B. tuberculata*, *B. afer*, *Dialeurodes kirkoldyi*, *D. citri* e *Trialeurodes vaporariorum*. Em 1991, Wool *et al.* usando padrões de esterase sugeriram variações entre os biótipos de *B. tabaci* ocorrendo em vários estados da Colômbia. A partir dessa evidência, os autores postularam a existência de raças geográficas. Nesse mesmo estudo, observou-se que amostras de *B. tabaci* originárias da Flórida, Califórnia e Kênya também possuíam diferenças em seus padrões de isoenzimas. Liu *et al.* (1992) usando padrões definidos de esterase sugeriram o método isoenzimático como uma alternativa para a diferenciação entre os biótipos de *B. tabaci*. Perring *et al.*, em 1992, usaram 14 sistemas de isoenzimas para analisar populações de *B. tabaci* coletadas em culturas comerciais de algodão e brócolis e em uma cultura de planta ornamental, poinsetia. Dos resultados obtidos, os autores observaram que dos 18 *loci* analisados, seis eram polimórficos e que, em cada um desses *loci* polimórficos, a população coletada em cultura de algodão possuía um ou mais alelos únicos. Ainda nesse mesmo estudo, postulou-se que as populações encontradas em brócolis e poinsetia derivaram de uma mesma população ancestral. A partir das informações geradas pelos perfis eletroforéticos de isoenzimas foram identificados por Coats *et al.* (1994), nos Estados Unidos e América Central, dois biótipos de *B. tabaci* em função dos seus padrões de esterase: o biótipo **A** (algodão, batata-doce ou tabaco) e o biótipo **B** (poinsetia ou abóbora). O biótipo **B** difere em algumas características biológicas do **A**, principalmente pela indução de desordens fitotóxicas, transmissão de fitovirose, fecundidade, espectro de hospedeiros e elevados níveis de resistência a inseticidas (Brown *et al.*, 1995). Analisando-se o perfil de esterase de 40 populações coletadas ao redor do mundo, Brown *et al.* (1995)

identificaram 12 variantes eletroforéticos de *B. tabaci* da América Central, África e Índia. Nesse mesmo estudo, os autores postularam, a partir das informações geradas pelos padrões de esterase, que o biótipo B representaria um complexo de espécies. Em 1997, Gunning *et al.*, usando padrões de esterase distinguiram o biótipo B, introduzido na Austrália, do biótipo não B, nativo daquele país. Além disso, pelos padrões de isoenzima os autores determinaram o potencial desses dois biótipos de *B. tabaci* em intercruzarem. Por esse mesmo princípio, Ryckewaert e Alauzet (2001) analisaram populações de mosca branca de ocorrência nas Antilhas e determinaram que uma parte dessas populações possuía perfil isoenzimático relacionado ao biótipo B de origem americana e que indivíduos coletados em *Jatropha gossypifolia* apresentavam diferenças nos perfis isoenzimáticos e tinham a capacidade de trocar material genético, por meio de cruzamentos entre machos e fêmeas, com o biótipo N de *B. tabaci* originário de Porto Rico.

Mesmo em função do potencial de uso das isoenzimas, esta técnica apresenta algumas limitações, tais como: 1) o perfil isoenzimático gerado por um indivíduo pode estar relacionado a expressão de uma dada isoenzima em um dado tecido; 2) por ser um marcador de natureza bioquímica, este pode sofrer oscilações em função das características fisiológicas do inseto em um dado momento. Soma-se a isso, o fato de que em determinados casos, os caracteres morfológicos não são suficientes para a distinção entre os biótipos de *B. tabaci*. Dessa forma, surge a necessidade de se utilizar outras estratégias que possam ser mais precisas e que não sofram influência de condições fisiológicas do organismo em um dado momento e assim garantir uma identificação mais precisa da espécie de aleirodídeo que está sendo estudada. Por isso, os métodos moleculares baseados em DNA estão sendo desenvolvidos e usados como ferramentas auxiliares para a identificação dos biótipos de *B. tabaci* em virtude desse inseto representar uma ameaça para as culturas de valor comercial (De Barro & Driver, 1997).

Os principais tipos de marcadores moleculares baseados em DNA podem ser classificados em dois grupos de acordo com a metodologia utilizada para identificá-los: a) hibridação ou; b) amplificação de DNA. No primeiro caso, utiliza-se uma sonda de DNA marcada com isótopo radioativo ou fluorescente que seja complementar a região do genoma que se deseja estudar. No segundo, são utilizados *primers* sintéticos de DNA que sejam específicos para uma dada região do genoma. Nesse caso, ocorre a amplificação de um número considerável de cópias apenas do segmento que se deseja estudar. A vantagem desse último está no fato de que se dispensa o emprego de material radioativo, como também, pode-se realizar as análises a partir de pequenas quantidades de DNA extraídos da

amostra. Essa estratégia é particularmente importante para a mosca branca *B. tabaci*, uma vez que, em virtude das suas dimensões reduzidas (em torno de 1 mm de comprimento), técnicas baseadas na amplificação de regiões do genoma são mais adequadas para esse inseto. Esse fato foi confirmado por Brown *et al.* (2005) que analisaram o conteúdo de DNA do núcleo de machos e fêmeas de *B. tabaci* por citometria de fluxo e determinaram que estes possuíam em torno de 1,04 pg e 2,06 pg de DNA. Fazendo-se as devidas conversões, os autores determinaram que o genoma de *B. tabaci* possuía em torno de 1020 Mb, correspondendo a cinco vezes o tamanho do genoma da mosca de fruta *Drosophila melanogaster*. Assim, técnicas baseadas em DNA estão sendo aplicadas ao estudo da variabilidade genética desse aleirodídeo em função dessas quantidades de DNA por núcleo haplóide. Uma técnica aplicada ao estudo da variabilidade de *B. tabaci* é o RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso). O princípio dessa técnica consiste em utilizar *primers* de 10 nucleotídeos de comprimento e de seqüência aleatória em reações de PCR ajustadas para baixas condições de anelamento desses *primers* randômicos (Williams *et al.*, 1990). O resultado consiste na amplificação de vários fragmentos de DNA em virtude do anelamento aleatório dos *primers* ao longo do genoma da amostra estudada. Esses fragmentos são convertidos em dados binários (presença ou ausência de bandas) e, posteriormente, usados para a determinação das relações filogenéticas entre populações ou espécies, como também, para a determinação de perfis eletroforéticos (*fingerprints* genômicos) das amostras analisadas. Utilizando-se essa técnica, por exemplo, Gawel & Bartlett (1993) e Perring *et al.* (1993) usando o DNA de indivíduos de *B. tabaci* distinguiram dois biótipos: A e B. Os resultados indicaram que essas moscas-brancas, similares morfologicamente, representavam biótipos diferentes. Assim, devido a existência de numerosas formas variantes de *B. tabaci*, seria adequado conduzir um estudo sobre a diversidade genética, fisiológica e morfológica de todas as formas variantes de *B. tabaci* antes de uma definição das relações taxonômicas entre as formas A e B. Guirao *et al.* (1994) utilizando a técnica de RAPD, determinaram os perfis eletroforéticos específicos para *T. vaporariorum* e *B. tabaci*. Além disso, para as populações de *B. tabaci*, foi possível observar diferenças intrapopulacionais, como também, diferenciar as populações coletadas nas regiões de Múrcia e Tenerife na Espanha. Em 2000, Lima *et al.* distinguiram os biótipos B e BR por perfis de amplificação de RAPD, correlacionando a distribuição de populações dentro do biótipo B em função do tipo da planta hospedeira. Nesse mesmo ano, Martinez *et al.* (2000) usando um único *primer* de RAPD fizeram a distinção entre três biótipos de *B. tabaci*, sendo que, um desses biótipos era restrito à cultura de mandioca. Em

todos os trabalhos utilizando-se a técnica de RAPD fica evidente que os perfis de marcadores indicam a existência de vários biótipos, como também, a variação nos perfis desses marcadores intrapopulacionalmente. Esse resultado, em função das características da técnica, pode estar associado a variações nas condições de amplificação, resultando em perfis de difícil reprodução. Sendo assim, uma alternativa, é a utilização de outros marcadores para corroborar ou desfazer as premissas obtidas com a técnica de marcadores moleculares RAPD.

Cervera *et al.* (2000) utilizaram a técnica de AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) para a determinação das relações filogenéticas entre biótipos de *B. tabaci*. A técnica de AFLP consiste em quatro etapas: 1) digestão do DNA genômico com duas enzimas de restrição; 2) adaptadores de DNA são ligados aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem; 3) uma fração dos fragmentos é amplificada por PCR utilizando-se *primers* desenhados para a região dos adaptadores; 4) eletroforese dos fragmentos amplificados pelo PCR específico. Por essa técnica um grande número de marcadores pode ser analisado em um único gel, permitindo uma amostragem ampla e simultânea de um genoma. Soma-se a isso o seu grande poder de detecção de variabilidade genética por meio do polimorfismo de presença ou ausência de sítios de restrição e a ocorrência ou não de amplificação. Por esse método, então, os autores anteriormente citados, analisando 354 bandas polimórficas obtidas em duas reações de amplificação com o uso de duas combinações de *primers*, conseguiram diferenciar *B. tabaci* das espécies de *B. medinae* e *B. afer*. Analisando-se, apenas, os biótipos de *B. tabaci*, os autores distinguiram quatro grupos: 1) K (Paquistão), H (Índia), II (Paquistão), M (Turquia) e I (Paquistão); 2) Q (Espanha), Cowpea (Nigéria) e B (Espanha); 3) A (Arizona) e; 4) S (Espanha) e Cassava (Nigéria).

Várias estratégias têm sido aplicadas aos estudos de caracterização molecular dos biótipos de *B. tabaci* buscando-se uma melhor compreensão dessa espécie de aleirodídeo. Uma dessas novas abordagens é a análise da região ITS1 do rDNA. Essas seqüências caracterizam-se pela conservação em sua composição nucleotídica. Pequenas variações podem ser detectadas nas seqüências e então utilizadas como parâmetro de comparação entre os vários biótipos de mosca branca. Por essa metodologia, De Barro *et al.* (2000) sustentam a teoria de ocorrência de monofilia para cada biótipo e, também, um forte padrão de distribuição geográfica. Pelas análises de seqüenciamento da região ITS, os autores demonstraram que as populações das Américas (incluindo o biótipo A) formavam um clado de elevada similaridade genética com o clado de *B. tabaci* biótipo B (responsável

pelo prateamento das folhas de certas espécies de plantas) e com o clado de um biótipo proveniente do norte da África e região do Mediterrâneo que não provocava o característico prateamento das folhas. Ainda pelo estudo do rDNA, os autores sugerem que o fenômeno de prateamento é um evento recente e que o biótipo de não prateamento é a forma ancestral.

Frohlich *et al.* (1999) analisando as regiões 16S rDNA e citocromo oxidase I (COI) no DNA mitocondrial fizeram uma reconstrução filogenética e geográfica para os biótipos de *B. tabaci*. Pelos dados obtidos pelas análises das seqüências, observou-se que a região 16S foi menos informativa do que a COI. Dos 429 caracteres examinados para a região COI, 185 locais foram invariáveis, ou seja, não houve variação de bases nitrogenadas em determinada posição da seqüência, 244 foram variáveis, apresentando mudanças em uma dada posição da seqüência e 108 foram informativos, ou seja, houve mudança de base nitrogenada, permitindo identificar os biótipos de *B. tabaci*. Para a região 16S rDNA foram analisados 456 caracteres, sendo 298 invariáveis, 158 variáveis e 53 informativos. Por esse método, a construção de um dendrograma e a sua conseqüente análise filogenética revelaram uma separação de *B. tabaci* em função da sua origem geográfica. As informações geradas pela análise de DNAm a partir das seqüências COI e 16S rDNA indicaram que o biótipo B originou-se no velho mundo (Europa, Ásia e África).

Fazendo a análise da região de DNA mitocondrial relacionada com o gene da citocromo oxidase I (COI), Viscarret *et al.* (2003) analisaram populações de *B. tabaci* coletadas em várias culturas estabelecidas em diferentes pontos geográficos de seis províncias da Argentina e uma colonizando a cultura de tomate na Bolívia. Nesse estudo, os autores relataram a presença do biótipo B de *B. tabaci* no país argentino, como também, apresentaram evidências para novos haplótipos (chamados pelos autores de nativos ou locais) presentes tanto na Argentina quanto na Bolívia. Além disso, pela análise de comparação de seqüência gerada pela amplificação da região COI, esses haplótipos formaram um agrupamento sul-americano filogeneticamente distinto do agrupamento de *B. tabaci* presente no Novo Mundo.

Abdullahi *et al.* (2004) utilizando a técnica de PCR-RFLP conseguiram obter perfis para a discriminação entre as populações de *B. tabaci* associadas a infestações em culturas de mandioca das demais populações desse mesmo inseto que eram capazes de infestar culturas diferentes da mandioca. A partir da amplificação da região ITS1 seguida da digestão com enzimas de restrição, os autores obtiveram perfis de digestão que indicaram que as populações da África associadas à infestação de culturas de mandioca

representavam um grupo distinto, com um nível significativo de separação em sub-grupos não sendo estes sub-grupos ligados a distribuição geográfica. Ainda, nesse mesmo estudo, utilizando-se o padrão de digestão produzido pela endonuclease *Sma*I foi possível obter um perfil para ser usado no monitoramento do biótipo B de *B. tabaci* ao longo do cinturão produtor de mandioca africano.

Recentemente, De Barro *et al.* (2005) compararam as relações filogenéticas entre os genótipos de *B. tabaci* utilizando dados de seqüências que foram gerados por ITS1 e COI. A partir dessas informações, os autores sugerem seis grupos: 1) Ásia; 2) Bali; 3) Austrália; 4) África sub-Sahara; 5) Mediterrâneo/Ásia Menor/África; 6) Novo Mundo. Além desses grupos, uma grande coleção de genótipos oriundos de regiões da Ásia também foi identificada. Entretanto, esse grupo não apresentou forte associação com nenhum dos grupos descritos pelos autores. A partir dessas informações, os autores sugerem um sistema de identificação para *B. tabaci* a partir dos seis grupos descritos anteriormente.

Ainda, em 2005, De Barro estudando a coleção de genótipos da região da Ásia-Pacífico, obtida pela comparação de seqüências das regiões 16S e COI, por meio da análise de 15 *loci* de microssatélites demonstrou que aqueles genótipos poderiam ser agrupados em seis populações genéticas com pouco ou nenhum fluxo gênico entre elas. Além disso, quatro dessas seis populações genéticas foram ainda divididas em duas subpopulações com pouca evidência de fluxo gênico. Os dados do autor sugerem uma forte estrutura de populações com separação geográfica. Entretanto, o autor não descarta a possibilidade de influência de outros fatores na organização geral e na distribuição dessas populações de mosca branca.

Das informações obtidas, entende-se que as metodologias de marcadores moleculares fornecem hoje, valiosos instrumentos para a caracterização de populações naturais. Esses instrumentos tais como, o estudo da variação de proteínas (isoenzimas) e da variação do DNA (RAPD) poderão fornecer marcadores específicos para o complexo *B. tabaci*. O uso de marcadores moleculares específicos tem como vantagem principal a sua facilidade de detecção além de permitir o seu uso em associação a estudos de identificação de biótipos, o estabelecimento de relações filogenéticas entre diferentes espécies ou populações e a construção de mapas genéticos de interesse econômico. Os marcadores apresentam muitas vantagens, pois independem do estágio de desenvolvimento do organismo e não são influenciados pelas condições ambientais (Haymer, 1994). Esses dados serão de grande importância no monitoramento de populações com genes resistentes

à inseticidas, no estudo da dispersão das populações e no controle da entrada de novos biótipos de mosca branca em regiões agrícolas do Brasil.

Além da distinção entre os biótipos de *B. tabaci*, as metodologias moleculares são ferramentas úteis na identificação de outros aleirodídeos considerados pragas de interesse quarentenário como, por exemplo, a mosca negra dos citros, *Aleurocanthus woglumi*. A introdução de novas pragas em áreas isentas pode ocasionar sérios problemas à agricultura de um país, não apenas sob o ponto de vista econômico, mas também ambiental e social. Visando minimizar o risco de introdução de novas espécies ou biótipos de organismos potencialmente nocivos, adotam-se medidas quarentenárias, as quais têm como referência básica, a lista de pragas quarentenárias para o país.

Por isso, a identificação e o desenvolvimento de marcadores moleculares específicos para os biótipos de *B. tabaci* será de grande utilidade para o estabelecimento de estratégias baseadas em DNA, para o monitoramento destes quando em áreas agrícolas, auxiliando na interceptação de amostras infestadas por meio de métodos mais eficientes, precisos e de maior sensibilidade de detecção.

## **OBJETIVOS**

Utilizando-se os marcadores de RAPD no estudo dos biótipos de *B. tabaci* e outras espécies de insetos, os objetivos foram:

- Identificar molecularmente as populações de *B. tabaci* coletadas em várias culturas;
- Analisar a dispersão das populações de mosca branca no Brasil;
- Caracterizar as populações do biótipo B de *B. tabaci* coletadas em várias culturas no Brasil por meio de marcadores RAPD;
- Realizar estudo comparativo do perfil molecular de *B. tabaci* e outras espécies de insetos.

## METODOLOGIA

### MANUTENÇÃO DAS POPULAÇÕES DE INSETOS

Adultos de várias populações de *B. tabaci*, assim como, outros aleirodídeos ou demais insetos, tanto de importância quarentenária quanto exóticos, enviados pelas DFA's (Delegacias Federais de Agricultura), por agricultores, instituições de ensino ou por empresas agrícolas, foram identificados segundo critérios morfológicos adotados internacionalmente e mantidos em etanol 70 % a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise molecular.

### EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE *B. tabaci* e OUTROS ALEIRODÍDEOS

Para a análise por RAPD, o DNA foi obtido macerando-se fêmeas adultas e individualizadas de cada amostra em 60  $\mu\text{L}$  de tampão de extração (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM; Triton X-100; proteinase K 60  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). O macerado foi incubado por 15 min a  $65^{\circ}\text{C}$ , seguindo-se fervura durante 10 min. O homogenato final foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

### EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE LEPIDÓPTEROS E COLEÓPTEROS

Para os estudos moleculares, o DNA de indivíduos de terceiro ínstar de lepidópteros e larvas de coleópteros foram extraídas a partir de um método previamente estabelecido (Queiroz *et al.*, 2004) seguindo-se adaptações dos protocolos de Agusti *et al.* (1999) e Monnerat *et al.* (2004).

Submeteu-se um inseto inteiro à maceração e, a seguir, adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de tampão de extração (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,3 % e Proteinase K 120  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), incubando-se por 30 min a  $65^{\circ}\text{C}$ . O homogenato foi centrifugado por 10 min a 10000xg e, o sobrenadante, transferido para um tubo plástico. Adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e as fases foram homogeneizadas em vortex por 5 s. O material foi centrifugado por 10 min a 10000xg a

10 °C. A fase aquosa foi então transferida para um novo tubo plástico, repetindo-se a etapa anteriormente descrita.

O DNA foi precipitado pela adição de 30 µL de NaCl 5 M e 1 mL de etanol absoluto incubando-se por 2 h a – 20 °C. Após centrifugação a 10000xg por 10 min a 10 °C, o DNA precipitado foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70 %, seco à temperatura ambiente, ressuspensão em TE 0,1 X (Tris-HCl 1 mM pH 8, EDTA 0,1 mM) e armazenado a – 20 °C. Para as análises de RAPD, utilizou-se o DNA diluído dez vezes (100 ng) em TE 0,1 X.

#### EXTRAÇÃO DE DNA DE MOSCA NEGRA *Aleurocanthus woglumi*

Fêmeas individualizadas de *A. woglumi* foram maceradas e o seu DNA extraído em 100 µL de tampão de extração (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,3 % e proteinase K 60 µg.mL<sup>-1</sup>). A seguir, completou-se o volume com 200 µL de tampão de extração. O macerado foi incubado por 15 min a 65 °C, seguindo-se fervura durante 6 min e centrifugação a 10000xg por 10 s. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo plástico e mantido a – 20 °C até o momento do uso.

#### EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE COCCINELÍDEOS

Para a caracterização molecular, amostras individualizadas de coccinelídeos foram maceradas e o DNA extraído em 100 µL de tampão de extração (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM; Triton X-100; proteinase K 60 µg.mL<sup>-1</sup>). A seguir, completou-se o volume com 500 µL de tampão de extração e o macerado foi incubado por 15 min a 65 °C, seguindo-se fervura durante 6 min e centrifugação a 10000xg por 10 s. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo plástico e mantido a – 20 °C até o momento do uso. Para a realização das reações de RAPD, adicionou-se 5 µL do sobrenadante em 100 µL de tampão TE 0,1 X.

## REAÇÃO DE RAPD

As reações de amplificação foram realizadas em 30  $\mu\text{L}$  de uma mistura contendo 24,9  $\mu\text{L}$  de água milliQ autoclavada, 3,0  $\mu\text{L}$  de tampão 10 X (Tris-HCl 60 mM pH 8,8, KCl 500 mM e  $\text{MgCl}_2$  20 mM, Amersham, CA, USA), 1,2  $\mu\text{L}$  de um *primer* de seqüência aleatória (Operon Technologies, Inc.) na concentração de 10  $\mu\text{M}$  (Tabela 1), 0,6  $\mu\text{L}$  de dNTP 10 mM, 0,3  $\mu\text{L}$  de *Taq* DNA polimerase na concentração de 1  $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  (Amersham, CA, USA) e 4  $\mu\text{L}$  de DNA (20 ng).

## PRIMERS DE RAPD USADOS NAS ANÁLISES MOLECULARES

Para a obtenção dos perfis de marcadores moleculares das populações de insetos analisadas nesse trabalho, foram utilizados vários *primers* (Operon Technologies, Inc.) decaméricos de composição aleatória de nucleotídeos (Tabela 1).

Tabela 1 – *Primers* de RAPD utilizados na determinação dos perfis eletroforéticos das diversas populações de insetos submetidas à análise molecular.

<i>Primer</i>	Seqüência 5' → 3'
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPA-04	AATCGGGCTG
OPA-05	AGGGGTCTTG
OPA-10	GTGATCGCAG
OPA-11	CAATCGCCGT
OPA-13	CAGCACCCAC
OPA-15	TTCCGAACCC
OPA-17	GACCGCTTGT
OPA-20	GTTGCGATCC
OPR-06	GTCTACGGCA
OPR-07	ACTGGCCTGA

## CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO

As amplificações foram efetuadas em termociclador (PTC-100 MJ Research) contendo uma etapa inicial de desnaturação de 3 min a 94 °C, programado para 45 ciclos de desnaturação de 1 min a 93 °C, anelamento por 1 min a 35 °C e extensão por 2 min a 72 °C e uma etapa final de extensão de 5 min a 72 °C.

## PROCEDIMENTO PADRÃO PARA A IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE INSETOS

Foi realizada com a padronização utilizando-se os *primers* OPA-04, OPA-10, OPA-11 e OPA-13 para a identificação molecular dos biótipos de mosca branca, demais aleirodídeos e insetos quarentenários, recebidos de várias localidades do país e armazenados na coleção biológica de referência de insetos e ácaros da Estação Quarentenária de Germoplasma Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, uma vez que, aqueles *primers* foram os que apresentaram variação nos perfis de fragmentos de DNA entre as populações de insetos analisados (Lima *et al.*, 2000). Este procedimento foi utilizado como triagem para a identificação dos biótipos de *B. tabaci* e outros insetos antes de cada experimento.

## VARIAÇÃO MOLECULAR UTILIZANDO MARCADORES RAPD

As análises de variabilidade genética utilizando RAPD foram realizadas em diferentes parâmetros, tais como, cultura, região geográfica, espécies e biótipos. Nesse sentido, foram feitas comparações com populações de *B. tabaci* de outros países, com populações de diferentes localidades dentro do Brasil e com populações de diferentes culturas dentro do Distrito Federal.

### A) ANÁLISE DE POPULAÇÕES DE MOSCAS BRANCAS EM CULTURA DE MANDIOCA

O perfil de RAPD em populações de aleirodídeos ocorrendo em culturas de mandioca do Brasil e do Paraguai (Tabela 2) foi obtido a partir de cinco indivíduos

coletados aleatoriamente e analisados com os *primers* OPA-02, OPA-04, OPA-10, OPA-11 e OPA-13.

Tabela 2 – Populações de mosca branca ocorrendo em culturas de mandioca no Brasil e Paraguai, utilizadas nos estudos de identificação e caracterização moleculares.

Código	Localidade	Cultura
54	Magé - RJ	Mandioca
101	Paraguai	Mandioca
127	Paraguai	Mandioca
128	Paraguai	Mandioca
130	Paraguai	Mandioca
186	Magé - RJ	Mandioca
187	Porto Real - RJ	Mandioca
212	Cajazeiras - CE	Melão
226	Brasília - DF	Algodão
228	Feira de Santana - BA	Mandioca
229	Coração de Maria - BA	Mandioca
230	Conceição do Jacuípe - BA	Mandioca
235	Ivinhema - MS	Quiabo
236	Deadópolis - MS	Mandioca
237	Deadópolis - MS	Mandioca
238	Ivinhema - MS	Mandioca
249	Tibau - RN	Mandioca
250	Santo Amaro - BA	Mandioca
251	Santo Amaro - BA	Mandioca
252	Governador Mangabeira - BA	Mandioca
253	Governador Mangabeira - BA	Mandioca
254	Cruz das Almas - BA	Mandioca
255	João Pinheiro - MG	Mandioca

## B) ANÁLISE DE POPULAÇÕES DE MOSCA BRANCA EM DIFERENTES CULTURAS NO BRASIL

Para as análises de variabilidade genética foram utilizados cinco indivíduos pertencentes a populações de *B. tabaci* que foram coletadas em culturas dos Estados Unidos, como também, em culturas estabelecidas em várias localidades do Brasil (Tabela 3), com os *primers* OPA-02, OPA-03, OPA-05, OPA-10, OPA-11, OPA-13, OPA-15, OPA-20, OPR-06 e OPR-07.

Tabela 3 – Populações de *B. tabaci* coletadas em várias regiões do Brasil e utilizadas nos estudos de variabilidade genética.

Região	Código	Procedência	Cultura
Análise 1 Cento-Oeste Nordeste Sudeste USA	61	Riverside – CA - USA	Melão
	62	Riverside – CA - USA	Melão
	23	Janaúba - MG	Algodão
	60	Recife - PE	Malva
	81	Campo Grande - MS	Leguminosa Forrageira
	106	Miguelópolis - SP	Soja
	119	Limoeiro do Norte - CE	Feijão
	179	Tibau - RN	Tomate
	194	Cambucí - RJ	Pepino
	226	Brasília - DF	Algodão
Análise 2 Cento-Oeste Nordeste Sudeste Norte	8	Aracati - CE	Melão
	15	Boa Vista - RR	Melão
	138	Viçosa - MG	Soja
	151	Campos de Goytacazes - RJ	Couve
	158.5	Recife - PE	Couve
	168	Buritis - GO	Feijão
	184	Park Branco - RN	Melão
	222	Juazeiro - BA	Melancia
	233.1	Mogi Mirim - SP	Algodão
240	Itiquira - MT	Algodão	

X Cultura não especificada.

### C) MONITORAMENTO DE POPULAÇÕES DE MOSCA BRANCA NO DISTRITO FEDERAL EM DIFERENTES CULTURAS

Nos estudos de monitoramento para a verificação da presença das populações do biótipo B de *B. tabaci*, utilizaram-se fêmeas adultas coletadas nas mesmas localidades do Distrito Federal nos anos de 2000 e 2001, ocorrendo em culturas de berinjela, tomate, pepino, abóbora e feijão, mantidas tanto em campo quanto em casa de vegetação.

A seguir, para a análise da dinâmica da variabilidade genética daquelas populações coletadas nos anos de 2000 e 2001, foram usadas como padrão de comparação outras populações de *B. tabaci* biótipo B coletadas em várias culturas no Brasil em 1999 (Tabela 4).

Nas análises de RAPD de ambas as estratégias empregaram-se os *primers* OPA-04, OPA-10, OPA-11, OPA-13 e OPA-15 utilizando-se cinco indivíduos de cada amostra.

Tabela 4 – Populações de *B. tabaci* coletadas no Distrito Federal nos anos de 2000 e 2001 e em outras regiões do Brasil no ano de 1999.

Região (Ano)	Código	Localidade	Cultura
BRASIL 1999	226 <sup>1</sup>	Cenargen - DF	Algodão
	249 <sup>2</sup>	Tibau - RN	Mandioca
	64 <sup>3</sup>	Mançuba - BA	Abóbora
	75 <sup>3</sup>	Goiânia - GO	Pepino
	116 <sup>3</sup>	Limoeiro do Norte - CE	Feijão
	126 <sup>3</sup>	Jaboticabal - SP	Berinjela
	220 <sup>3</sup>	Juazeiro - BA	Tomate
Distrito Federal 2000	226 <sup>1</sup>	Cenargen - DF	Algodão
	249 <sup>2</sup>	Tibau - RN	Mandioca
	263 <sup>3</sup>	Planaltina - DF	Berinjela
	264 <sup>3</sup>	Planaltina - DF	Tomate
	265 <sup>3</sup>	Planaltina - DF	Pepino
	266 <sup>3</sup>	Planaltina - DF	Abóbora
	288 <sup>4</sup>	Cenargen - DF	Tomate
	289 <sup>4</sup>	Cenargen - DF	Abóbora
	290 <sup>4</sup>	Cenargen - DF	Feijão
Distrito Federal 2001	226 <sup>1</sup>	Cenargen - DF	Algodão
	249 <sup>2</sup>	Tibau - RN	Mandioca
	02 <sup>4</sup>	Cenargen - DF	Tomate
	03 <sup>4</sup>	Cenargen - DF	Abóbora
	04 <sup>4</sup>	Cenargen - DF	Feijão
	18 <sup>3</sup>	Planaltina - DF	Tomate
	19 <sup>3</sup>	Planaltina - DF	Pepino
	20 <sup>3</sup>	Planaltina - DF	Berinjela

1 Biótipo BR de *Bemisia tabaci* usado como padrão;

2 Biótipo B de *Bemisia tabaci* usado como padrão;

3 Populações coletadas em campo;

4 Populações coletadas em culturas mantidas em casa de vegetação na Embrapa – Recursos Genéticos e biotecnologia.

#### D) ANÁLISE MOLECULAR ENTRE OS BIÓTIPOS DE *B. tabaci*

Realizaram-se várias reações de amplificação com os *primers* OPA-04, OPA-10, OPA-11, OPA-13 e OPA-15 para a determinação dos perfis de marcadores de RAPD que sejam específicos para a distinção entre os biótipos de *B. tabaci* (Tabela 5).

Tabela 5 – Biótipos de *Bemisia tabaci* usados nos estudos de determinação de perfis de marcadores moleculares de RAPD.

Código	Localidade	Cultura	Biótipo de <i>B. tabaci</i>
7	Marrocos	Pepino	Q
8	Nigéria	Mandioca	Cassava
14	Espanha	Tomate	Q
NI	Várzea Grande - MT	Algodão	NI
61	Riverside – CA - USA	Melão	B
62	Riverside – CA - USA	Melão	A
140	Carolina - MA	Soja	B
184	Park Branco - RN	Melão	B
226	Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia - DF	Algodão	BR
288	Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia - DF	Tomate	B

NI Amostra não identificada;

X Cultura não especificada.

#### E) ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE ALEIRODÍDEOS

Para a caracterização molecular, cinco indivíduos coletados a partir de várias populações de aleirodídeos (Tabela 6) foram comparados por meio dos seus padrões de marcadores moleculares de RAPD com a mosca branca *B. tabaci*, biótipos B e BR usando-se os *primers* OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-10, OPA-11, OPA-13, OPA-15, OPA-17 OPA-20 e OPR-06, para a determinação de possíveis bandas de DNA com potencial para a identificação dessas diferentes espécies de aleirodídeos.

Tabela 6 – Populações de aleirodídeos utilizados nas determinações dos perfis de marcadores de RAPD para a identificação molecular.

Código	Procedência	Cultura	Identificação
34	Rondonópolis – MT	Tomate e Almeirão	<i>B. tabaci</i> biótipo BR
236	Deadópolis – MS	Mandioca	<i>B. tuberculata</i>
255	Embrapa Cerrado - DF	Mandioca	<i>Aleurothrixus aepim</i>
261	Florianópolis – PI	Caju	<i>Aleurodicus cocois</i>
264	Planaltina – DF	Tomate	<i>B. tabaci</i> biótipo B
278	Flórida – USA	Citros	<i>Aleurocanthus woglumi</i>
279	Texas – USA	Citros	<i>A. woglumi</i>
282	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF	Fumo	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>

#### F) ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE *B. tabaci* E OUTRAS ESPÉCIES DE INSETOS DE INTERESSE AGRONÔMICO

Indivíduos de várias espécies de insetos de interesse agrícola (Tabela 7) foram comparados por meio dos seus padrões de marcadores moleculares de RAPD com a mosca branca *B. tabaci*, biótipo B usando-se os *primers* OPA-04, OPA-07, OPA-10, OPA-11 e OPA-13. Em função dos resultados foi possível a determinação de possíveis bandas de DNA com potencial para a clonagem e desenvolvimento de marcadores a serem utilizados na identificação do biótipo B de *B. tabaci*.

Tabela 7 – Populações de insetos utilizadas nas determinações dos perfis de marcadores de RAPD.

Procedência	Cultura	Identificação
Mossoró – RN	Melão	<i>B. tabaci</i> biótipo B
Texas – USA	Citros	<i>A. woglumi</i>
Embrapa – Recursos Genéticos e biotecnologia	X	<i>Trichogramma</i>
Embrapa – Recursos Genéticos e biotecnologia	X	<i>A. grandis</i>
Embrapa – Recursos Genéticos e biotecnologia	X	<i>S. frugiperda</i>
Embrapa – Recursos Genéticos e biotecnologia	X	<i>A. gemmatalis</i>
Embrapa – Recursos Genéticos e biotecnologia	X	<i>Nephaspis gemini</i>

X Indica a manutenção em criação sob condições controladas (dieta, fotoperíodo e umidade).

#### ANÁLISE POR ELETROFORESE DOS FRAGMENTOS DE DNA GERADOS POR RAPD

Os produtos de amplificação originários das reações de RAPD foram separados em gel de agarose 1,5 % submerso em tampão TBE 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 1 mM) durante 3 h a 160 V. Ao término da corrida, os géis foram corados por 30 min em uma solução corante contendo brometo de etídio ( $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), descorados por 30 min em água destilada e fotografado sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 300 nm. A documentação fotográfica foi feita usando-se o sistema EagleEye II still video system™ (Stratagene).

Em todos os géis, marcadores de massa molecular (100 bp Ladder - INVITROGEN) foram usados para a determinação da massa molecular dos fragmentos amplificados pela técnica de RAPD.

## ANÁLISE DOS DADOS

As fotos das amplificações realizadas com os *primers* selecionados foram usadas para a análise do polimorfismo entre os indivíduos da população. As bandas presentes nos géis foram consideradas como marcadores RAPD. Foi gerada então uma matriz de similaridade levando-se em consideração as relações entre indivíduos, *primers* e massas moleculares das bandas obtidas com um dado *primer*. Utilizou-se o valor 1 para a presença de um marcador e 0 para a ausência. No caso de dúvida o número 9 foi usado como padrão. A seguir, a planilha obtida foi submetida a um programa de análise estatística multivariada para a determinação das distâncias genéticas entre os indivíduos. A matriz de similaridade foi obtida por meio do coeficiente de Jaccard (Sneath e Sokal, 1973) e que, por meio da análise por UPGMA (unweighted pair-group method analysis), produziu-se um dendrograma que evidenciou o agrupamento dos indivíduos, utilizando-se o programa NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) versão 2.02 pc (Rholff, 1993).

A seguir, os valores obtidos e tabelados em uma planilha foram submetidos à análise de variância molecular (AMOVA) para a determinação estatística das possíveis origens das variabilidades encontradas nas populações pela aplicação de algoritmos específicos pelo programa Arlequin ver. 2000 (Schneider *et al.*, 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

As amostras de insetos coletadas em várias culturas de diversas localidades foram recebidas e mantidas na coleção biológica de referência de insetos da Estação Quarentenária de Germoplasma Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e, posteriormente, tiveram os seus perfis moleculares estabelecidos para identificação com o *primer* OPA-13. Os padrões de bandas produzidos por cinco indivíduos de cada população a ser identificada foram comparados com padrões de mosca branca *B. tabaci* previamente determinadas como sendo biótipo B ou BR (Figura 1).

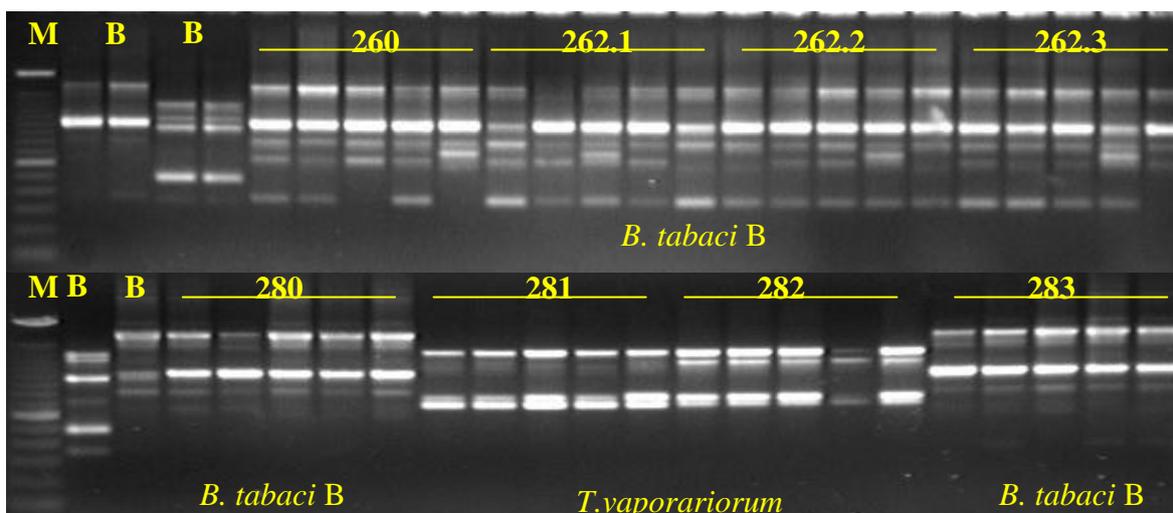


Figura 1 – Identificação de populações de mosca branca coletadas em culturas de várias localidades por meio de perfis de fragmentos de DNA obtidos com o primer OPA-13. A letra M indica o marcador 100 pb ladder (Gibco); As letras B e BR correspondem aos biótipos de *B. tabaci* usados como padrão de identificação. A barra indica os indivíduos analisados em cada amostra e, o número, o processo da amostra na coleção biológica de referência de insetos.

Das amostras analisadas no ano de 2000, 29 foram identificadas como sendo o biótipo B de *B. tabaci*, uma foi identificada como *Aleurodicus cocois* e duas como *Trialeurodes vaporariorum*. Amostras de mosca negra (*Aleurocanthus woglumi*), provenientes dos EUA, tiveram o seu padrão de bandas determinado para fazer parte do acervo de identificação do banco de mosca branca. Além disso, uma amostra coletada em feijão proveniente de Chapecó - SC apresentou um perfil de bandeamento não correspondente àqueles pertencentes ao banco de marcadores moleculares de insetos de interesse quarentenário (Tabela 8).

Tabela 8 – Identificação molecular das amostras recebidas no ano de 2000.

Código	Localidade	Cultura	Identificação
226 <sup>1</sup>	Vitrine Cenargen - DF	Algodão	<i>Bemisia tabaci</i> BR
249 <sup>2</sup>	Tibau - RN	Mandioca	<i>Bemisia tabaci</i> B
260	Lavras - MG	Brócolis	<i>B. tabaci</i> B
261	Floriano - PI	Cajú	<i>Aleurodicus cocois</i>
262.1	Baraúna - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
262.2	Baraúna - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
262.3	Baraúna - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
262.4	Baraúna - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
263	Planaltina - DF	Berinjela	<i>B. tabaci</i> B
264	Planaltina - DF	Tomate	<i>B. tabaci</i> B
265	Planaltina - DF	Pepino	<i>B. tabaci</i> B
266	Planaltina - DF	Abóbora	<i>B. tabaci</i> B
267	Petrolina - PE	Tomate/Plantas invasoras	<i>B. tabaci</i> B
268.1	Nova Porteirinha - MG	Batata	<i>B. tabaci</i> B
268.2	Nova Porteirinha - MG	Tomate	<i>B. tabaci</i> B
269	Mossoró - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
270	Mossoró - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
271	Mossoró - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
272	Mossoró - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
273	Mossoró - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
274	Mossoró - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
275	Mossoró - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
276	Mossoró - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
277	Mossoró - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
280	Lavras - MG	Pepino	<i>B. tabaci</i> B
281	Águas Mornas - SC	Abobrinha/Pepino	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>
282	Cenargen - DF	Fumo	<i>T. vaporariorum</i>
283	Pau Branco - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
284	Cajazeiras - CE	Melão	<i>B. tabaci</i> B
285	Mossoró - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
286	Baraúna - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
287	Chapecó - SC	Feijão	NI
288	Cenargen - DF	Tomate	<i>B. tabaci</i> B
289	Cenargen - DF	Abóbora	<i>B. tabaci</i> B
290	Cenargen - DF	Feijão	<i>B. tabaci</i> B

1 Biótipo BR de *Bemisia tabaci* usado como padrão;

2 Biótipo B de *Bemisia tabaci* usado como padrão;

NI Amostra ainda não identificada.

A mesma estratégia utilizada para a identificação de amostras de mosca branca no ano de 2000 foi aplicada para a análise molecular dos indivíduos recebidos no ano de 2001, onde observou-se a predominância de amostras contendo indivíduos pertencentes ao biótipo B de *B. tabaci* (Tabela 9).

Tabela 9 – Identificação molecular das amostras recebidas no ano de 2001.

Localidade	Cultura	Identificação
Jaboticabal - SP	Feijão	NI
Cenargen - DF	Tomate	<i>Bemisia tabaci</i> B
Cenargen - DF	Abóbora	<i>B. tabaci</i> B
Cenargen - DF	Feijão	<i>B. tabaci</i> B
Sinop - MT	Soja/Algodão/Erva daninha	NI
Várzea Grande - MT	Algodão	NI
Várzea Grande - MT	Erva Daninha	NI
Várzea Grande - MT	Algodão	NI
Várzea Grande - MT	Algodão	NI
Várzea Grande - MT	Soja	NI
Pau Branco - RN	Feijão	<i>B. tabaci</i> B
Pau Branco - RN	Tomate	<i>B. tabaci</i> B
Pau Branco - RN	Mandioca	<i>B. tabaci</i> B
Cajazeiras - PB	Melão	<i>B. tabaci</i> B
Cajazeiras - PB	Melão	<i>B. tabaci</i> B
Mossoró - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
Mossoró - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
Mossoró - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
Mossoró - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
Mossoró - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
Mossoró - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
Mossoró - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
Mossoró - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
Mossoró - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
Planaltina - DF	Tomate	<i>B. tabaci</i> B
Planaltina - DF	Pepino	<i>B. tabaci</i> B
Planaltina - DF	Berinjela	<i>B. tabaci</i> B
Mossoró - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
Mossoró - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
Mossoró - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
Baraúna - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
Tibau - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
Toca da Raposa - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
PADF - DF	Couve verde	<i>B. tabaci</i> B
PADF - DF	Couve manteiga	<i>B. tabaci</i> B
PADF - DF	Couve verde	NI
PADF - DF	Couve verde	NI
Tibau - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B
Baraúna - RN	Melão	<i>B. tabaci</i> B

NI Amostra ainda não identificada.

Além disso, duas amostras enviadas da Espanha e de Marrocos, contendo o biótipo Q de *B. tabaci*, tiveram os seus padrões de bandeamento determinados para fazer parte dos perfis eletroforéticos do banco de alelodídeos. O mesmo foi feito com uma amostra proveniente da Nigéria contendo o biótipo cassava de *B. tabaci* (Figura 2).

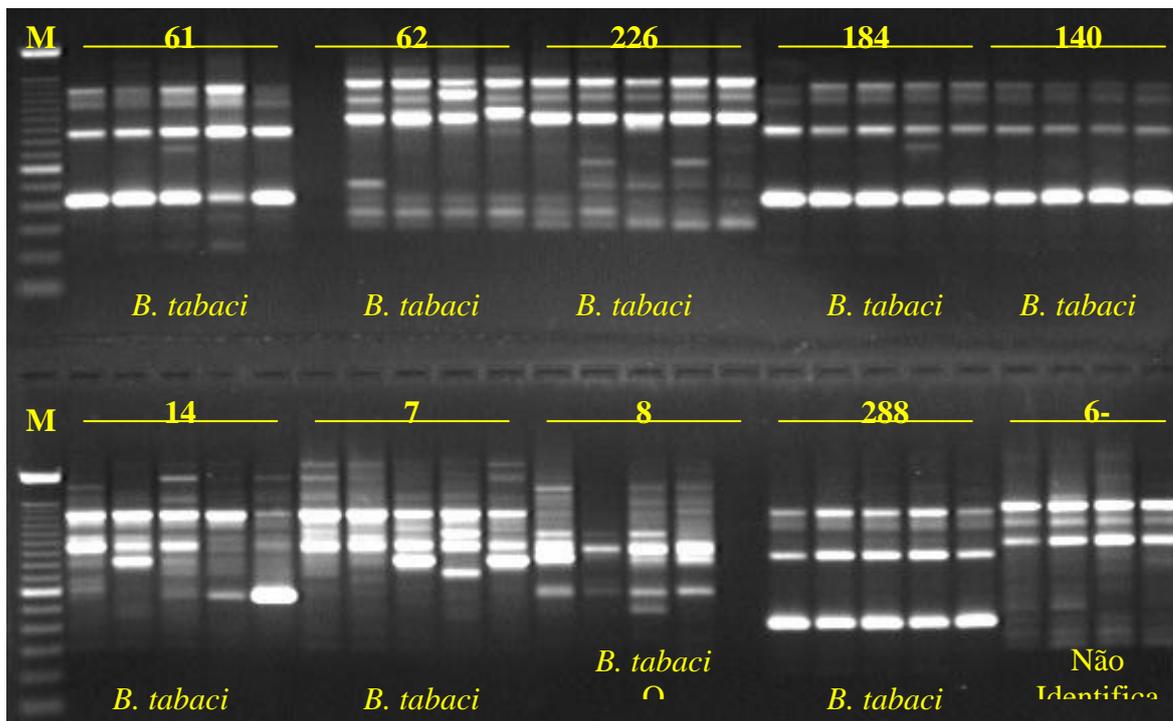


Figura 2 – Padrões de bandas obtidos de amplificação com o primer OPA-10 dos biótipos de mosca branca. A letra M indica o marcador 100 pb ladder (Gibco). O número e a barra indicam o código no banco de aleirodódeos e o número de indivíduos analisados.

Ao longo da identificação molecular, as amostras originárias de duas localidades de Mato Grosso apresentaram um padrão molecular não relacionado com os biótipos de *B. tabaci* ou qualquer outro aleirodódeo cujo perfil tenha sido anteriormente determinado. Em futuros surtos populacionais em Mato Grosso, amostras poderão ser coletadas nas mesmas localidades e culturas, para um estudo mais detalhado para a averiguação dessa possível variabilidade entre os aleirodódeos em estudo.

Dos resultados obtidos a partir da identificação das amostras provenientes das várias localidades do Brasil, pode-se observar que o biótipo B de *B. tabaci* apresenta-se disperso na maioria dos estados do Brasil. As exceções ficam com os estados do Amazonas, Acre, Amapá, Paraná e Sergipe (Figura 3).



Figura 3 – Distribuição das populações de *B. tabaci* nas diversas unidades da federação. Os pontos indicam a procedência das amostras que foram identificadas por metodologia molecular de RAPD.

Resultados anteriores de identificação, descritos por Lima *et al.* (1999), têm demonstrado que o biótipo BR pode estar presente em alguns estados, tais como, Mato Grosso, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Goiás e Distrito Federal. Nas regiões de Baraúna (RN), Mossoró (RN), Pau Branco (RN) e Tibau (RN), por exemplo, o biótipo B de *B. tabaci* é o predominante. Esses resultados indicam uma dispersão do biótipo B de *B. tabaci* nas diferentes localidades do Brasil. Além disso, percebe-se que não existe uma preferência por cultura predada, indicando a extrema adaptabilidade dessa praga a diferentes condições nutricionais.

Wool *et al.* (1994) usando padrões de esterase foram capazes de diferenciar as espécies *B. tabaci* e *B. tuberculata* em função dos seus perfis eletroforéticos a partir de amostras coletadas em várias localidades da Colômbia. Por esse estudo, os autores

observaram sutis diferenças sugerindo, então, uma diferenciação genética em função da distribuição geográfica dessas populações. Além disso, analisando-se apenas as populações de *B. tabaci*, os autores observaram variações nas frequências de esterase associadas com as localidades de coleta. Além disso, em algumas dessas localidades foram descritas a aplicação de inseticidas. Esse último fato pode ser responsável por variações fisiológicas no inseto terminando por influenciar nos padrões de esterase, uma vez que, esse marcador bioquímico sofre influência de fatores ambientais. Dessa forma, surge a necessidade de se utilizar uma estratégia complementar para a confirmação dessas informações.

Em 1993, Gawel e Bartlett utilizaram a técnica de RAPD para o estudo de *B. tabaci*. Utilizando vinte *primers* de RAPD, os autores distinguiram dois biótipos de ocorrência nas culturas dos Estados Unidos: os biótipos A e B. Em função desses resultados, os autores apontam para a aplicação do RAPD na diferenciação de biótipos de *B. tabaci* que apresentem semelhança morfológica e proximidade genética.

Sendo assim, os perfis moleculares de RAPD obtidos nesse estudo confirmaram as descrições estabelecidas anteriormente por Lima *et al.* (1999), expandindo-se a possibilidade de uso desses marcadores para a distinção entre os biótipos de *B. tabaci* e para o monitoramento da dispersão de populações específicas de um determinado biótipo de mosca branca.

Além disso, De Barro & Driver (1997) sugerem que a técnica de RAPD é adequada para a análise de insetos pois permite utilizar amostras frescas ou conservadas em álcool para a identificação dos biótipos de *B. tabaci* e outros aleirodídeos. Desta forma, uma estratégia molecular pôde ser estabelecida para atender a necessidade de se detectar a presença do biótipo B nas culturas do Brasil a partir de amostras armazenadas em álcool com relativa rapidez e com precisão para o estabelecimento de laudos de interesse quarentenário.

## ESTUDOS MOLECULARES DE MOSCA BRANCA EM MANDIOCA

A partir do estabelecimento de uma estratégia de identificação molecular por RAPD, cinco indivíduos das populações de mosca branca, coletadas em culturas de mandioca do Brasil e do Paraguai, foram usados para a determinação do perfil de

fragmentos de DNA com o *primer* OPA-13, onde observou-se a presença de diferentes populações de mosca branca (Tabela 10).

Tabela 10 – Identificação por meio de três *primers* de RAPD de populações de mosca branca coletadas em culturas de mandioca, provenientes do Brasil e do Paraguai, a serem utilizadas nos estudos de caracterização molecular.

Código	Origem	Cultura	Identificação
54	Magé – RJ	Mandioca	NI
101	Paraguai	Mandioca	<i>B. tabaci</i> B
127	Paraguai	Mandioca	<i>B. tabaci</i> B
128	Paraguai	Mandioca	<i>B. tabaci</i> B
130	Paraguai	Mandioca	NI
186	Magé – RJ	Mandioca	NI
187	Porto Real – RJ	Mandioca	NI
2121	Cajazeiras – CE	Melão	<i>B. tabaci</i> B
2262	Brasília – DF	Algodão	<i>B. tabaci</i> BR
228	Feira de Santana – BA	Mandioca	<i>Aleurothrixus aepim</i>
229	Coração de Maria – BA	Mandioca	<i>A. aepim</i>
230	Conceição do Jacuípe – BA	Mandioca	<i>A. aepim</i>
2353	Ivinhema – MS	Quiabo	<i>B. tuberculata</i>
236	Deadópolis – MS	Mandioca	<i>B. tuberculata</i>
237	Deadópolis – MS	Mandioca	<i>B. tuberculata</i>
238	Ivinhema – MS	Mandioca	<i>B. tuberculata</i>
249	Tibau – RN	Mandioca	<i>B. tabaci</i> B
250	Santo Amaro – BA	Mandioca	<i>A. aepim</i>
251	Santo Amaro – BA	Mandioca	<i>A. aepim</i>
252	Governador Mangabeira – BA	Mandioca	<i>A. aepim</i>
253	Governador Mangabeira – BA	Mandioca	<i>A. aepim</i>
254	Cruz das Almas – BA	Mandioca	<i>A. aepim</i>
255	João Pinheiro – MG	Mandioca	<i>A. aepim</i>

1 Biótipo B de *B. tabaci* usado como padrão de comparação;

2 Biótipo BR de *B. tabaci* usado como padrão de comparação;

3 Amostra padrão de comparação de *B. tuberculata*;

NI Amostra não identificada.

A análise molecular permitiu identificar a presença de *B. tuberculata*, *B. tabaci* biótipo B e *Aleurothrixus aepim* nas culturas de mandioca, assim como, outros biótipos ainda não identificados (Figura 4).

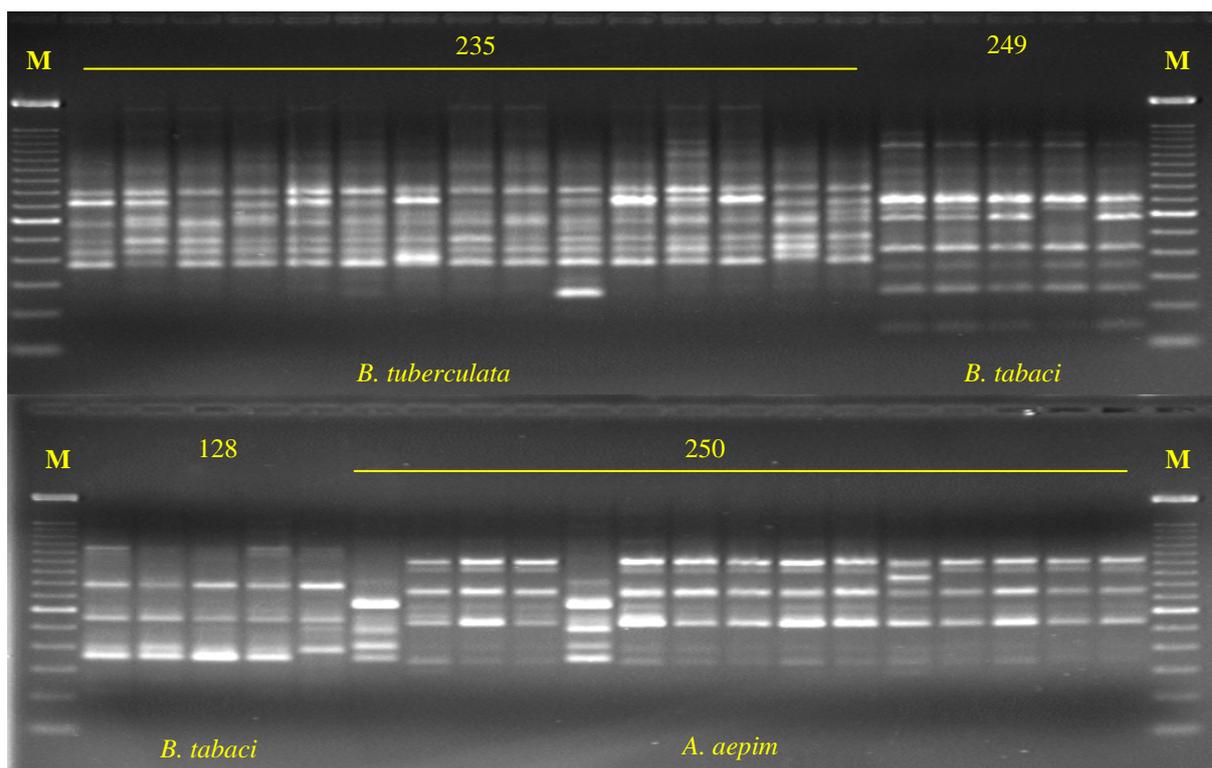


Figura 4 – Comparação de perfis de fragmentos de DNA de mosca branca obtidos a partir de ampliações com os primers OPA-04 e OPA-11. A letra M indica o marcador molecular 100 pb ladder (GIBCO). A barra indica o número de indivíduos analisados em cada população.

Usando esses *primers* foi possível identificar, molecularmente, as populações de *B. tabaci* biótipo B, *B. tuberculata* e *Aleurothrixus aepim*. Dos resultados obtidos, o que apresentou maior preocupação foi a detecção do biótipo B de *B. tabaci* em culturas de mandioca na região de Tibau (RN). Este inseto é o vetor do vírus ACMV (African Cassava Mosaic Vírus ou, vírus do mosaico africano da mandioca), causador de sérios prejuízos nas culturas de mandioca em vários países africanos.

Uma vez identificadas as amostras de mosca branca, estas foram analisadas pela técnica de RAPD com os *primers* OPA-02, OPA-04, OPA-10, OPA-11 e OPA-13 para a determinação das relações filogenéticas entre estas populações (Figura 5).

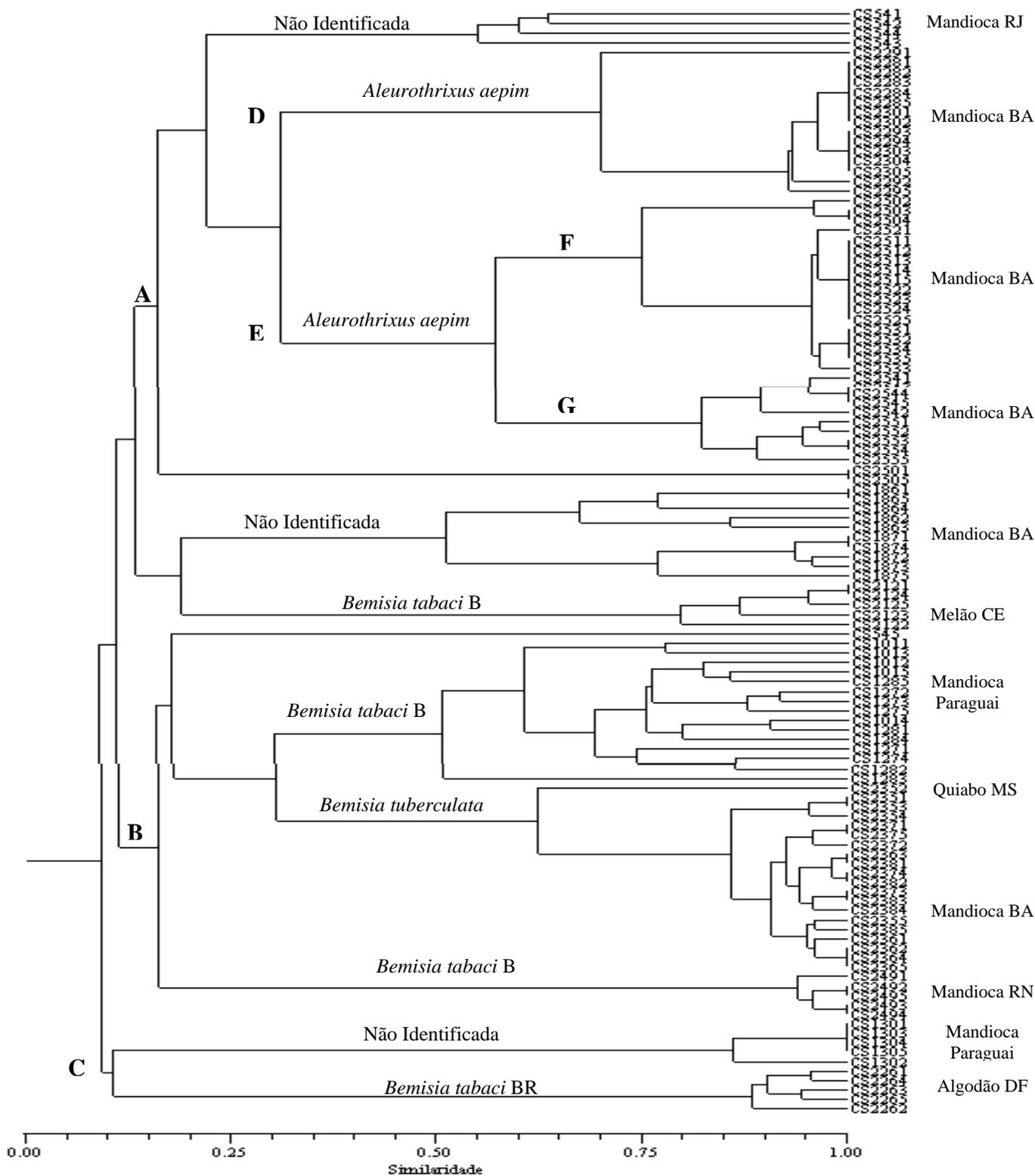


Figura 5 – Análise de agrupamento de populações de aleirodídeos coletadas em culturas de mandioca do Brasil e do Paraguai. Os códigos representam: CS54, CS186 e CS187, amostras coletadas em mandioca (RJ); CS101, CS127, CS128 e CS130, mandioca (Paraguai); CS212, melão (CE); CS226, algodão (DF); CS228, CS229, CS230, CS250, CS251, CS252, CS253 e CS254, mandioca (BA); CS235, quiabo (MS); CS236, CS237 e CS238, mandioca (MS); CS249, mandioca (RN); e CS255, mandioca (MG).

Por meio da análise molecular observou-se a distribuição das populações de aleirodídeos em três agrupamentos principais. No agrupamento **A** foram encontradas todas as populações de *A. aepim* e uma população de *B. tabaci*. A partir da análise do dendrograma observou-se que *A. aepim* formou um agrupamento distinto de *B. tuberculata* e *B. tabaci* biótipo B (agrupamento **B**), apresentando similaridade em torno de 12 % em relação a essas espécies. Para *A. aepim*, foram identificadas duas divisões (**D** e **E**) que apresentaram em torno de 32 % de similaridade genética. A divisão **D** foi constituída pelas populações coletadas em 3 localidades distintas do estado da Bahia: Conceição do Jacuípe, Coração de Maria e Feira de Santana. A divisão **E** ficou composta por duas subdivisões (**F** e **G**) apresentando 57 % de similaridade entre si. A divisão **F** ficou composta por amostras de mosca branca coletadas em duas localidades da Bahia: Governador Mangabeira e Santo Amaro. A sub-divisão **G** ficou composta por duas populações coletadas em áreas distintas (BA e MG), apresentando 85 % de similaridade genética. Dentro do agrupamento **A** também foi identificada uma população de *B. tabaci* coletada em melão no Ceará. Essa amostra apresentou 15 % de similaridade em relação às populações de *A. aepim*.

No agrupamento **B** foram identificadas todas as populações de *B. tabaci* coletadas em mandioca no Paraguai, todas as populações de *B. tuberculata* do Brasil (MS e BA) e uma população de *B. tabaci* do Brasil. Nesse grupo, um resultado interessante observado foi que as populações de *B. tuberculata* do Brasil e *B. tabaci* biótipo B originárias do Paraguai apresentaram similaridade em torno de 31 %, formando um agrupamento único. Já as populações de *B. tabaci* biótipo B coletadas em culturas de mandioca na região de Tibau (RN) apresentaram menor grau de similaridade (em torno de 17 %) com as populações de *B. tuberculata* coletadas no Brasil e com as populações de *B. tabaci* do Paraguai.

O biótipo BR de *B. tabaci* apresentou baixa similaridade (10 %) em relação às demais populações analisadas neste estudo, formando um agrupamento distinto (agrupamento **C**).

A análise do dendrograma permitiu identificar que duas amostras de populações coletadas em culturas de mandioca nos estados do Rio de Janeiro e Bahia e uma originária do Paraguai formaram clados distintos nos agrupamentos **A** e **C**. Esse resultado reflete com o observado para a análise por RAPD, cujo padrão de bandas dessas populações não permitiu uma identificação por método molecular.

Nesse estudo, ressalta-se a variabilidade das populações de *B. tabaci*, uma vez que, estas apresentaram ampla distribuição, sendo identificadas nos três agrupamentos formados no dendrograma.

A partir das informações geradas pelos perfis eletroforéticos de RAPD pelas várias populações de aleirodídeos, os dados binários dessas amostras foram utilizados em uma análise de variância molecular (AMOVA) para a determinação das fontes de variabilidade genética que foram identificadas no dendrograma. Dos resultados obtidos, observou-se que 90,25 % da fonte de variação era originária de variações entre os grupos analisados e que, 9,75 % da variação era proveniente de dentro das populações. Esses dados indicam uma elevada fonte de variabilidade genética para cada espécie de aleirodídeo analisada nesse estudo. Além disso, as amostras de *B. tabaci* biótipo B coletadas em culturas de melão no Ceará e em mandioca no Rio Grande do Norte, formaram um agrupamento distinto dos demais indivíduos do mesmo biótipo, sugerindo uma possível preferência pela cultura dentro de um mesmo biótipo.

A mosca branca (*B. tabaci*) biótipo B é o principal vetor do vírus do mosaico africano da mandioca (ACMV), responsável por enormes prejuízos na cultura de mandioca no continente africano, causando uma redução de 50 % na produção de mandioca (Fauquet & Fargette, 1990), com prejuízos superiores a 2 bilhões de dólares (Basu, 1995). Em uma revisão analisando a disseminação do vírus ACMV e *B. tabaci* no continente africano, Legg (1999) indica que a disseminação do vírus do mosaico da mandioca ocorre de duas formas: 1) por meio das manivas infectadas pelo vírus ou; 2) pela mosca branca, *B. tabaci* atuando como vetor. Estudos têm demonstrado que *B. tabaci* é o único vetor do ACMV (African Cassava Mosaic Virus – Vírus do Mosaico Africano da Mandioca). Ainda, alguns estudos têm relatado a eficiência de transmissão do vírus por esse aleirodídeo. Esses valores variam de 0,15 % a 1,7 %, mas podem chegar até a 13 %. O autor da revisão ainda sugere que o fator chave da epidemiologia observada nos países africanos se deve à mobilidade da mosca branca pois, em determinadas circunstâncias, este inseto pode se deslocar até 7 km do seu ponto original. Ainda, nessa mesma revisão, o autor relaciona que um dos fatores responsáveis pela epidemia desse vírus é o aumento da densidade populacional de *B. tabaci*. Após um levantamento sobre os dados de epidemia do ACMV em alguns países africanos, concluiu-se que a incidência do vírus estava relacionada com o aumento populacional da mosca branca. Isso foi comprovado em experimentos em Uganda, onde observou-se que entre os anos de 1992 e 1998, a população de *B. tabaci* aumentou 15 vezes.

Em função dessas informações, Maruthi *et al.* (2001) fizeram um estudo para determinar se a disseminação do ACMV estava associada a um novo biótipo de *B. tabaci*. Para essas determinações foram realizados testes de compatibilidade reprodutiva, fecundidade, desenvolvimento de ninfa e RAPD com 26 *primers*. Dos 26 *primers* utilizados, seis *primers* indicaram que uma considerável variação era observada entre os indivíduos de uma mesma população. Fazendo-se a análise por UPGMA, a partir do polimorfismo de bandas produzido por cinco indivíduos de uma mesma população coletada em áreas de epidemia do ACMV, como também, de áreas livres do vírus, o dendrograma gerado produziu um único e grande grupo, não havendo distinção entre as populações coletadas em culturas de mandioca em áreas de epidemia ou não do vírus ACMV. Os graus de similaridade entre os sub-grupos formados dentro do grupo principal variaram de 78 % a 89 %. Um resultado interessante apontado também pelos autores nesse trabalho foi a distinção entre as populações de *B. tabaci* coletadas na Índia em culturas de algodão e mandioca. Pelo dendrograma, essas duas populações se segregaram à parte do grupo principal, apresentando 45 % de similaridade genética. Além disso, Essas duas populações coletadas na Índia formaram dois agrupamentos distintos, com similaridade genética de 82 %. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos na análise das populações de *B. tabaci* e outros aleirodídeos desse estudo.

Em 2003, Abdullahi *et al.* analisaram populações de *B. tabaci* coletadas em mandioca na África e em outras culturas distribuídas ao redor do mundo pelas técnicas de RAPD e ITS. Os resultados de RAPD indicaram a formação de dois agrupamentos no dendrograma com a clara separação das populações de *B. tabaci* infectando culturas de mandioca. A análise de AMOVA indicou que 63,2 % da variação total era atribuída a diferenças entre as populações, 27,1 % era devida a variações em função da cultura predada e 9,8 % era em função de variações dentro das populações. Os autores fazendo a análise da região de ITS1 observaram que as populações de *B. tabaci* infectado a cultura de mandioca eram diferentes das demais populações e específicas em colonizar aquela cultura.

Abdullahi *et al.* (2004) utilizaram a técnica de PCR-RFLP a partir da região ITS1 de *B. tabaci* para obter perfis para a distinção entre as populações de mosca branca de ocorrência em mandioca e as populações de ocorrência em outras culturas. A partir da análise dos perfis de restrição da região ITS1, os autores sugerem que as populações de *B. tabaci* associadas a culturas de mandioca da África representam um grupo distinto, com um significativo nível de separação em sub-grupos e que estes não estavam ligados a

distribuição geográfica. A análise de variância molecular (AMOVA) revelou que a variação genética total de 47 % era atribuída a diferenças entre populações dentro dos grupos associados ao seu hospedeiro. Utilizando-se a enzima de restrição *Sma*I, os autores obtiveram um perfil de restrição para a identificação e monitoramento do biótipo B de *B. tabaci* ocorrendo em culturas de mandioca.

A partir dos dados observados nesse estudo e com a literatura disponível surge a necessidade de se estabelecer estratégias quarentenárias para evitar a entrada do vírus ACMV (African Cassava Mosaic Vírus - Vírus do Mosaico Africano da Mandioca), uma vez que, o aparecimento e o estabelecimento de populações de mosca-branca em áreas produtoras tem ocorrido em virtude do trânsito de manivas de mandioca. Recentemente, esse vírus foi detectado no Brasil em manivas de mandioca, provenientes de Angola. Além disso, foi encontrado nesse estudo o biótipo B de *B. tabaci* em cultura de mandioca no Brasil. Dessa forma, ressalta-se a necessidade de maiores estudos a respeito da variabilidade dessa espécie de aleirodídeo para o entendimento de quais fatores podem ser responsáveis por uma possível preferência pela cultura dentro de um mesmo biótipo de *B. tabaci*. Sendo assim, a partir dessas informações, uma estratégia molecular poderá ser estabelecida para atender a necessidade de se monitorar a presença do biótipo B na cultura da mandioca como uma prevenção à entrada do vírus do mosaico africano no Brasil.

#### ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE MOSCA BRANCA PRESENTES NO BRASIL

Inicialmente aos trabalhos de variabilidade genética, procedeu-se à identificação molecular das amostras coletadas para a determinação dos biótipos de mosca branca. Das amostras analisadas, observou-se que oito populações coletadas no Brasil pertenciam ao biótipo B e uma correspondia ao biótipo BR de *B. tabaci* (Tabela 11).

Tabela 11 – Populações de *B. tabaci* coletadas em culturas de várias regiões do Brasil usadas nos estudos de variabilidade genética.

Localidade	Cultura	Biótipo de <i>B. tabaci</i>
Riverside – CA – USA <sup>1</sup>	Melão	Biótipo B
Riverside – CA – USA <sup>2</sup>	Melão	Biótipo A
Janaúba – MG	Algodão	
Recife – PE	Malva	
Campo Grande – MS	Leguminosa Forrageira	
Miguelópolis – SP	Soja	Biótipo B
Limoeiro do Norte – CE	Feijão	
Tibau – RN	Tomate	
Cambucí – RJ	Pepino	
Brasília – DF	Algodão	Biótipo BR

1 Biótipo B de *B. tabaci* usado como padrão de comparação;

2 Biótipo BR de *B. tabaci* usado como padrão de comparação.

A partir das informações geradas pelos perfis de marcadores de RAPD, realizou-se um estudo de caracterização molecular de populações provenientes de várias culturas coletadas nas regiões nordeste, centro-oeste e sudeste do Brasil, como também, dos Estados Unidos, para efeitos de comparação. Submetendo-se o DNA dos indivíduos das dez populações de mosca branca ao procedimento de RAPD com dez *primers* decaméricos, foram observadas diferenças nos perfis de marcadores entre as várias amostras analisadas (Figura 6).

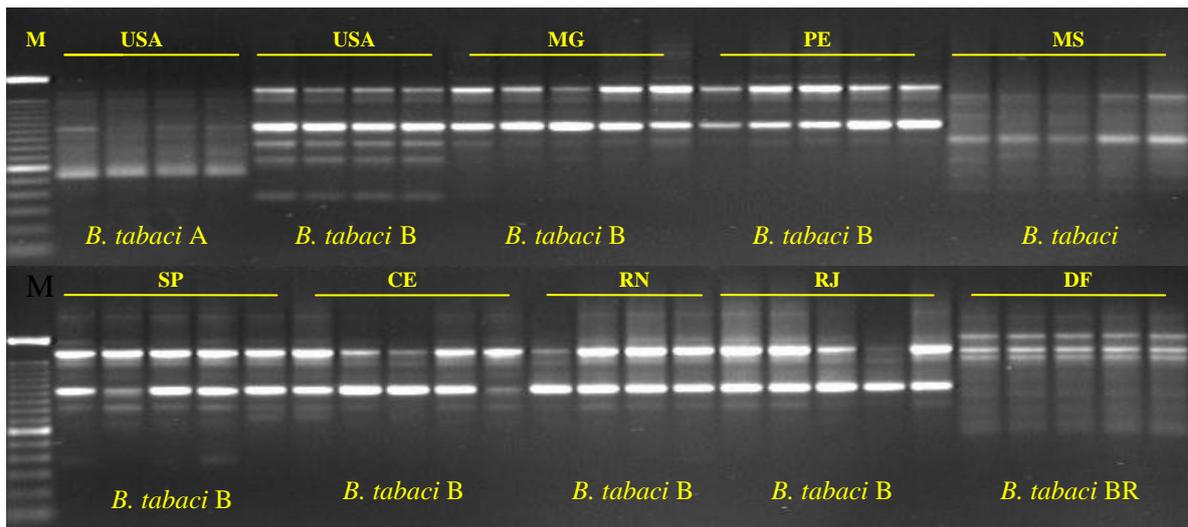


Figura 6 - Análise dos fragmentos de DNA obtidos com o primer OPA-13. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder. A barra indica o número de indivíduos analisados para cada população.

A análise dos marcadores moleculares produzidos pelo *primer* OPA-13 para o biótipo B de *B. tabaci* permitiu identificar dois distintos sinais de amplificação de 1050 pb e de 2000 pb em todas as amostras. Entretanto, para a amostra proveniente dos EUA, observou-se perfil de bandas na faixa de 300 pb a 1700 pb não identificável nas amostras originárias do Brasil. O biótipo A dos EUA produziu um perfil diferente de marcadores com uma banda de 550 pb característica. Resultado similar foi encontrado para o biótipo BR, produzindo um padrão de bandamento na faixa de 1500 pb a 1800 pb. A população coletada em leguminosa forrageira no estado do Mato Grosso do Sul gerou um perfil de bandas não relacionado aos biótipos envolvidos no estudo.

A partir da variação nos perfis de bandas e da impossibilidade de correlação da população coletada em leguminosa forrageira com os demais biótipos de mosca branca, utilizou-se os perfis de bandas de DNA produzidos pelos vários *primers* de RAPD pelas dez populações para a determinação do agrupamento destas por meio do programa NTSYS-pc (Rohlf, 1993). A análise dos padrões de bandas das amostras de mosca branca provenientes das regiões do Brasil e dos Estados Unidos permitiu organizar as populações em quatro agrupamentos principais (Figura 7).

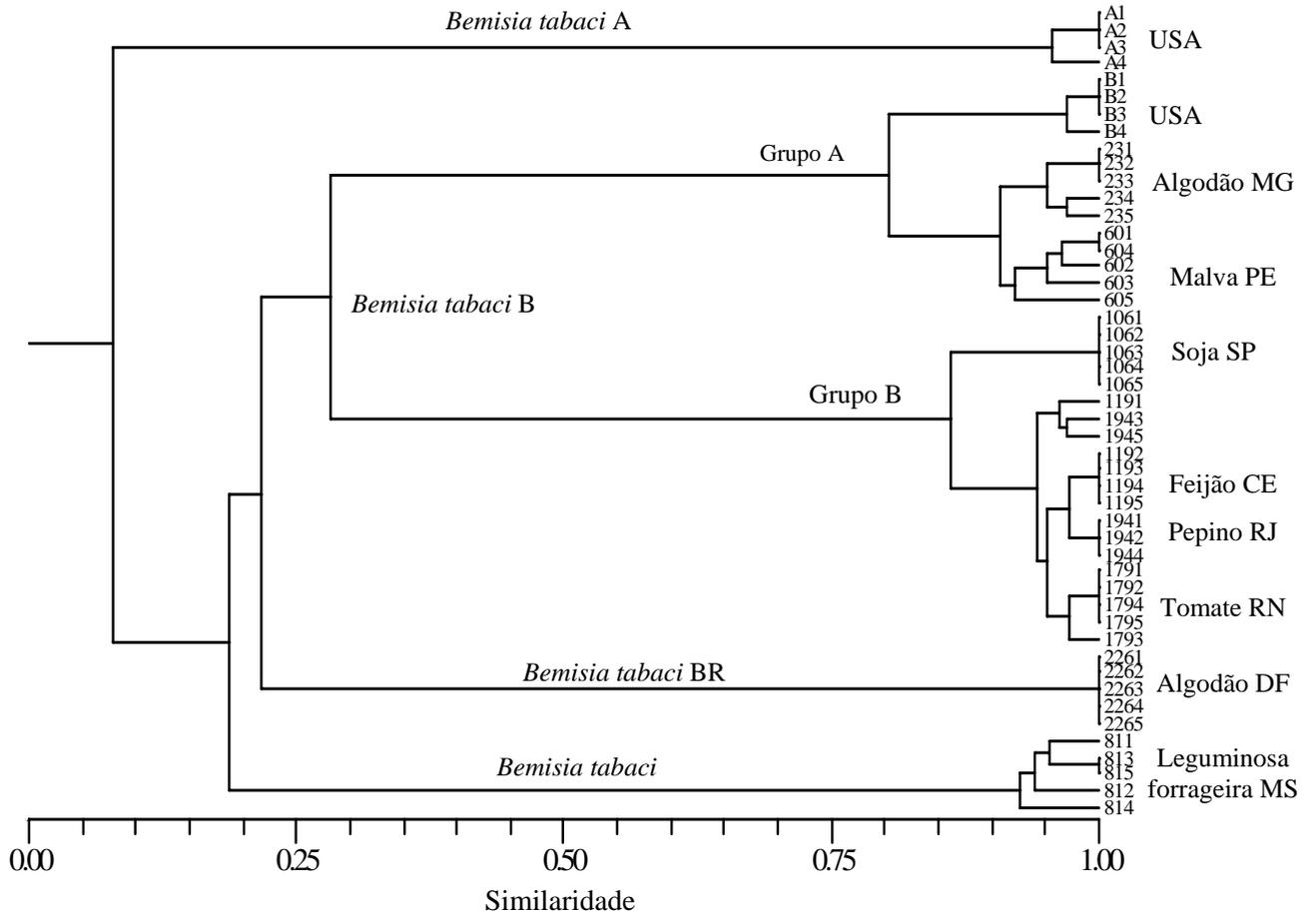


Figura 7 - Análise de agrupamento das populações de *B. tabaci* coletadas em diferentes culturas das regiões do Brasil e dos Estados Unidos.

O primeiro agrupamento foi constituído apenas pela população de mosca branca biótipo A originária dos EUA, apresentando uma similaridade de 7 % em relação aos demais grupos analisados. A segunda distribuição de populações ficou relativa ao biótipo B de *B. tabaci*, apresentando dois grupos (A e B) com aproximadamente 30 % de similaridade. Para o grupo A, observou-se que o biótipo B originário dos Estados Unidos apresentou similaridade de 80 % com as populações do Brasil coletadas em algodão e malva. Já as populações de mosca branca coletadas em algodão e malva apresentaram uma relação filogenética mais próxima, em torno de 90 %. O grupo B revelou que a população coletada em soja apresentou uma similaridade de 85 % em relação às populações de feijão, pepino e tomate. Observou-se, também, que as populações encontradas em feijão e pepino apresentaram maior similaridade entre si (97 %) do que em relação à população de tomate (95 %). No terceiro agrupamento, identificou-se o biótipo BR, coletado em algodão,

apresentando baixa similaridade (20 %) em relação às populações de *B. tabaci* biótipo B do Brasil e Estados Unidos. O último agrupamento correspondeu à população coletada em leguminosa forrageira cujos marcadores não apresentaram correspondência com as marcas genéticas dos demais biótipos, sugerindo ser um grupo diverso em relação aos demais biótipos analisados nesse estudo.

Em função dos agrupamentos observados no dendrograma, procedeu-se a análise de variância molecular (AMOVA) para a identificação da variabilidade genética entre os grupos e dentro de cada população em estudo (Tabela 12).

Tabela 12 – Análise de variância molecular (AMOVA) entre as populações coletadas em várias culturas e entre os indivíduos de uma mesma população.

	Algodão MG	Malva PE	Forrag. MS	Soja SP	Feijão CE	Tomate RN	Pepino RJ	Algodão DF
Algodão - MG	<b>0</b>	<b>62.50</b>	<b>99.10</b>	<b>98.40</b>	<b>98.12</b>	<b>98.37</b>	<b>97.24</b>	<b>99.18</b>
Malva – PE	37.50	<b>0</b>	<b>97.08</b>	<b>97.14</b>	<b>96.71</b>	<b>97.27</b>	<b>95.87</b>	<b>98.25</b>
Forrageira - MS	0.90	2.92	<b>0</b>	<b>98.82</b>	<b>98.68</b>	<b>98.80</b>	<b>97.79</b>	<b>99.40</b>
Soja – SP	1.60	2.86	1.18	<b>0</b>	<b>60.00</b>	<b>90.00</b>	<b>77.27</b>	<b>99.37</b>
Feijão – CE	1.88	3.29	1.32	40.00	<b>0</b>	<b>-25.00</b>	<b>-13.64</b>	<b>99.32</b>
Tomate - RN	1.63	2.73	1.20	10.00	125.00	<b>0</b>	<b>-13.64</b>	<b>99.36</b>
Pepino - RJ	2.76	4.13	2.21	22.73	113.64	113.64	<b>0</b>	<b>98.19</b>
Algodão - DF	0.82	1.75	0.60	0.63	0.68	0.64	1.81	<b>0</b>

Os números em negrito indicam a porcentagem de variação (%) entre as populações analisadas;

Os números na parte inferior da tabela indicam a porcentagem de variação (%) dentro das populações em estudo.

Observou-se que a maior fonte de variação genética era proveniente da variabilidade entre as populações. Essa variação correspondeu a um intervalo de 96,71 % até 99,40 %. As exceções ficaram para as relações entre as populações coletadas em feijão-PE e soja-SP (60 %), malva-PE e algodão-MG (62,5 %) e pepino-RJ e soja-SP (77,27 %).

Essas informações sugerem que as diferenças entre os grupos possam ser devidas a fatores relacionados com a disponibilidade da dieta, presença de predadores e com a aplicação de produtos químicos que podem atuar selecionando grupos com perfis genéticos ligeiramente diferentes dentro de um dado biótipo de *B. tabaci*. Soma-se ainda a essa variação dentro dos biótipos, a estratégia reprodutiva adotada pela espécie, uma vez que, a partenogênese arrenótoca é a forma de reprodução preferencial para manter os genes nas populações desse inseto. Essa estratégia é particularmente interessante para *B. tabaci* em virtude desta espécie representar um grupo cosmopolita. A reprodução assexuada assegura

o rápido crescimento da população para a utilização rápida dos recursos disponíveis. Sob condições ainda desconhecidas, a reprodução sexuada é a forma alternativa para a geração de novas combinações genéticas com o intuito de superar alguma barreira seletiva como, por exemplo, a pressão provocada pelo uso de produtos químicos. Esses fatores podem ser os responsáveis pela variação dentro de um biótipo, refletindo as diferenças que são observadas no dendrograma. Além disso, pelas análises de variância molecular (AMOVA) excluiu-se a influência da localização geográfica como fator determinante na separação entre as populações de *B. tabaci* biótipo B.

Em função dos resultados obtidos com as populações coletadas ao longo do ano de 2000 e visando confirmar os fatos obtidos anteriormente, realizou-se outra análise molecular com os mesmos *primers* de RAPD anteriormente citados para complementar os estudos de caracterização entre populações coletadas em culturas estabelecidas nas regiões norte, nordeste, centro-oeste e sudeste do Brasil (Tabela 13).

Tabela 13 – Populações de *B. tabaci* usadas nos estudos complementares de variabilidade genética coletadas em várias regiões do Brasil.

Localidade	Cultura	Biótipo de <i>B. tabaci</i>
Aracati/CE	Melão	
Boa Vista/RR	Melão	
Viçosa/MG	Soja	Biótipo B
Campos de Goytacazes/RJ	Couve	
Recife/PE	Couve	
Buritis/GO	Feijão	Biótipo BR
Park Branco/RN	Melão	
Juazeiro/BA	Melancia	Biótipo B
Mogi Mirim/SP	Algodão	
Itiquira/MT	Algodão	Biótipo BR

A análise das amostras provenientes de culturas das regiões Centro-Oeste, Nordeste, Sudeste e Norte com o *primer* OPA-02 permitiu distinguir padrões de bandas diferentes entre as populações analisadas (Figura 8).

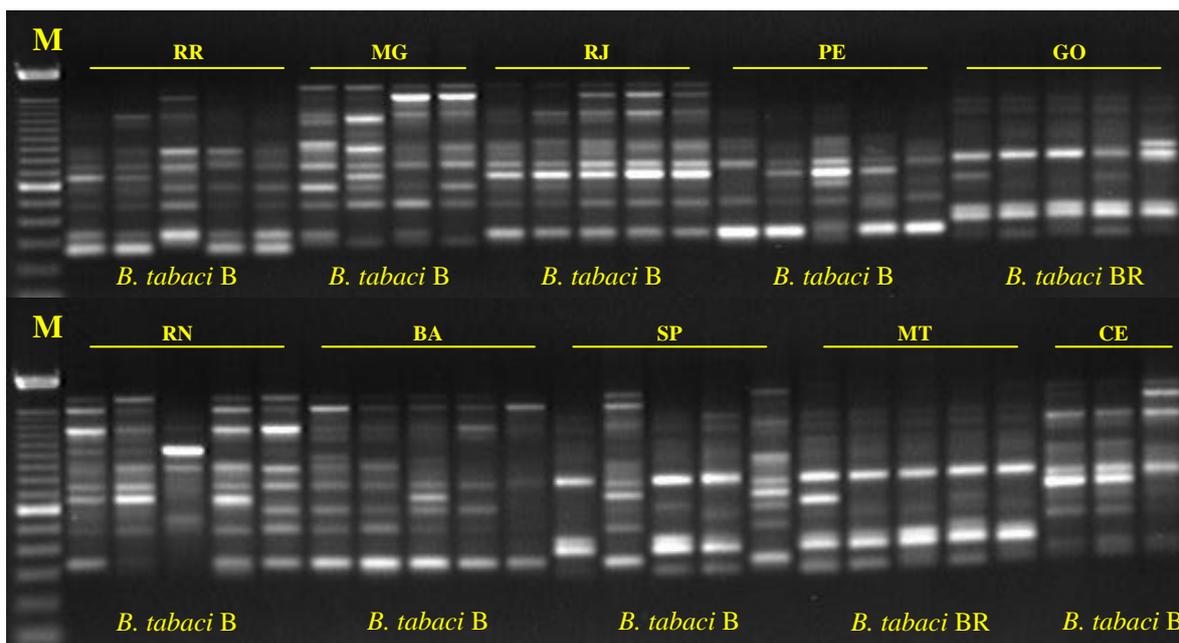


Figura 8 - Análise dos fragmentos de DNA obtidos com o primer OPA-02. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder. A barra indica o número de alelodídeos analisados.

As populações de *B. tabaci* biótipo BR coletadas em GO e MT produziram um perfil de bandas similar com dois sinais de amplificação em torno de 400 pb e 800 pb. Para as amostras de *B. tabaci* biótipo B observou-se polimorfismo nos fragmentos de RAPD sendo que, as populações coletadas em RJ, PE, RN e BA produziram uma banda de 350 pb comum a essas amostras.

Mais uma vez, em função da variação nos marcadores gerados entre as amostras, utilizou-se os perfis de bandas para a determinação do agrupamento destas pelo programa NTSYS-pc (Rohlf, 1993). A análise dos fragmentos obtidos pelas amostras de mosca branca provenientes das regiões do Brasil permitiu organizar as populações em 2 agrupamentos principais com similaridade de 22,5 % (Figura 9).

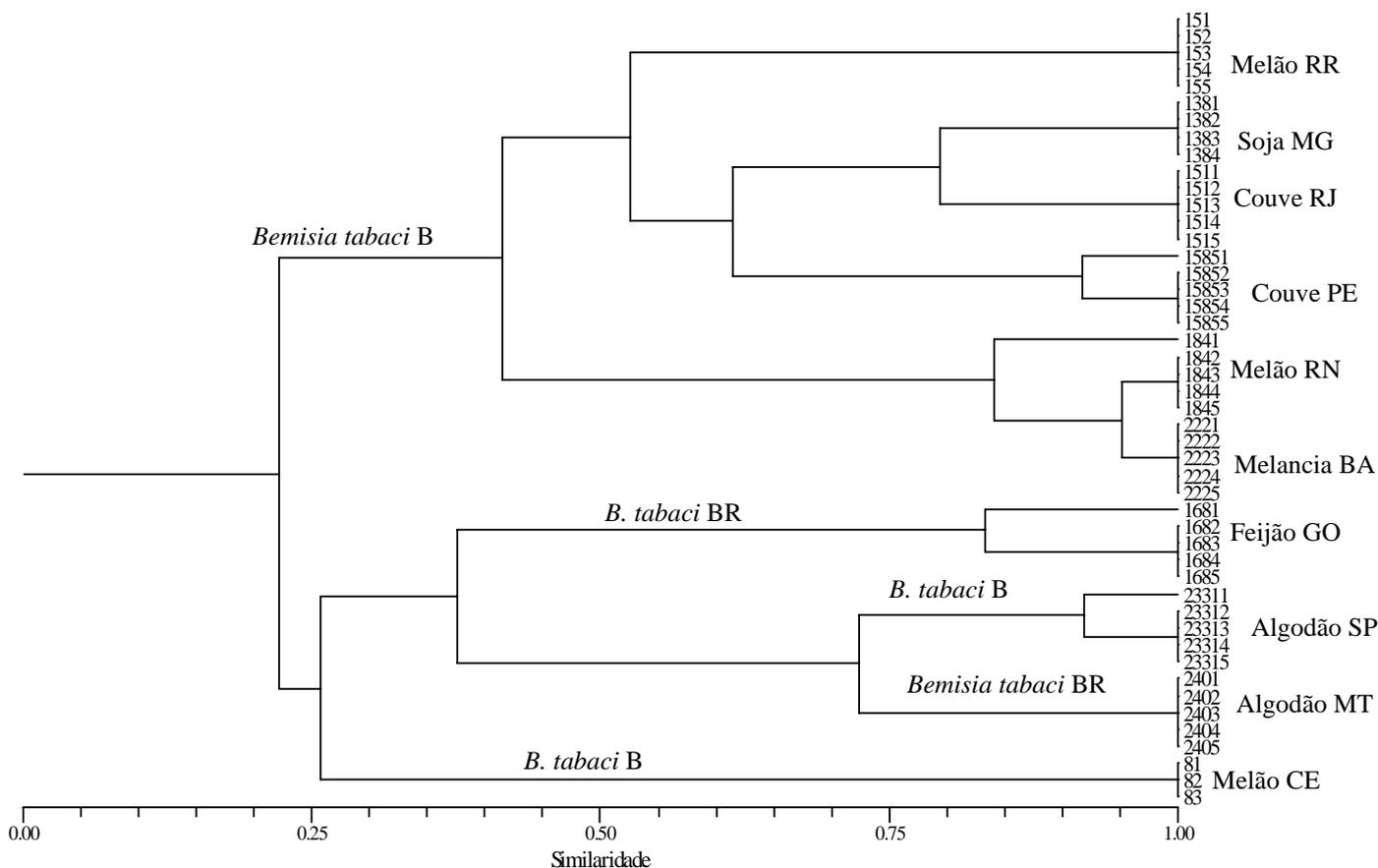


Figura 9 - Análise de agrupamento das populações de *B. tabaci* coletadas em culturas localizadas em diferentes regiões do Brasil.

O primeiro grupo ficou composto apenas pelas populações de *B. tabaci* biótipo B. Dentro desse grupo as populações coletadas em melão (RN) e melancia (BA) apresentaram 43 % de similaridade em relação aos demais do grupo. As populações coletadas em soja (MG) e couve (RJ) formaram um grupo apresentando similaridade de 82 %. A única amostra obtida da região norte formou um grupo independente dos demais, apresentando 50 % de similaridade genética. Uma amostra coletada em couve (PE) apresentou maior proximidade genética (58 %) com as populações coletadas em couve na região sudeste. Para o segundo grupo, observou-se a presença dos dois biótipos de *B. tabaci*. O biótipo BR coletado em cultura de feijão formou um grupo independente com 38 % de similaridade em relação às demais populações. A amostra de biótipo B coletada em melão no CE apresentou a menor similaridade em relação às demais populações componentes do grupo (26 %). Além disso, os indivíduos coletados em culturas de algodão nos estados de SP e MT apresentaram a maior similaridade dentro deste agrupamento (72 %). Contudo, pela

metodologia molecular previamente estabelecida para a identificação dos biótipos de mosca branca, observou-se a presença de biótipos distintos nessas amostras. Dessa forma, os resultados sugerem uma separação por cultura predada. Para averiguar essas observações, os marcadores moleculares gerados pelas populações foram submetidos a análise molecular de variância (Schneider *et al.*, 2000).

As populações coletadas em uma mesma cultura foram agrupadas e submetidas ao teste de variância molecular. Os resultados indicaram que 86,20 % da fonte de variação genética observada era resultante da composição genética das populações dentro dos grupos, 11,37 % resultante da variação entre os grupos e 2,44 % era proveniente da variabilidade dentro das populações. Prosseguiu-se à análise das amostras em função das regiões de coleta e observou-se que a maior fonte de variação era devida a variabilidade entre as populações dentro dos grupos. Por último, realizou-se a análise da variação entre as populações desse estudo observando-se que a maior fonte de variação era resultante da variabilidade entre as populações (97,53 %) e, em menor escala (2,47 %), dentro das populações. Os resultados indicam assim, que o fator cultura e local de estabelecimento da população não exercem efeitos pronunciados sobre a dinâmica genética dessas populações. Provavelmente, a estratégia reprodutiva adotada pela espécie, ou seja, ciclos partenogênicos intercalados por eventos de reprodução sexuada sejam fatores independentes ou pouco influenciados pelo tipo de dieta. Poderia-se postular também que as populações clonais estabelecidas em um área em conjunto quando em uma baixa frequência de migração e sob pressão de seleção provocada por agentes químicos possam estar contribuindo mais diretamente na variação dos perfis de marcadores moleculares que são encontrados nas populações de mosca branca *B. tabaci*.

Estudos bioquímicos e moleculares de *B. tabaci* têm fornecido substancial evidência no que diz respeito ao grau de polimorfismo entre populações de distintas regiões geográficas e/ou hospedeiros. Esta evidência é corroborada pela existência de biótipos. Recentes análises filogenéticas do DNA mitocondrial de populações de *B. tabaci* coletadas em diferentes hospedeiros e regiões geográficas, têm sugerido uma importante divergência genética entre populações geograficamente separadas. Entretanto, ainda não existem suficientes evidências biológicas e genéticas para separar o biótipo B do complexo *B. tabaci* (Kirk *et al.*, 2000).

Maiores estudos precisam ser conduzidos para se obter dados que possam ser aplicados na identificação e no monitoramento destes biótipos específicos em campo,

assim como, na averiguação dos fatores que são responsáveis pela sua distribuição geográfica e pela flutuação de marcadores dentro de um biótipo.

#### MONITORAMENTO DE POPULAÇÕES DE MOSCA BRANCA OCORRENDO EM CULTURAS NO DISTRITO FEDERAL

Em seguida, visando analisar se o mesmo fenômeno observado para os marcadores moleculares de populações de *B. tabaci* biótipo B coletadas em várias culturas e em vários locais do país, também ocorre em uma mesma localidade, foram realizados estudos de monitoramento de populações de mosca branca, a partir da análise com cinco *primers* de RAPD de fêmeas adultas coletadas nas mesmas áreas do Distrito Federal nos anos de 2000 e 2001, ocorrendo em culturas de berinjela, tomate, pepino, abóbora e feijão, mantidas tanto em campo quanto em casa de vegetação. Nesse estudo, também foram utilizadas populações de mosca branca, coletadas em várias localidades do Brasil, ao longo do ano de 1999, para comparação nos estudos de monitoramento. A partir das análises moleculares de identificação dos biótipos, observou-se que todas as populações de mosca branca coletadas pertenciam ao biótipo B (Tabela 14).

Tabela 14 – Populações de *Bemisia* coletadas no Distrito Federal nos anos de 2000 e 2001 e no Brasil no ano de 1999.

Ano	Código	Localidade	Cultura	Identificação
1999 BRASIL	226 <sup>1</sup>	Cenargen - DF	Algodão	<i>B. tabaci</i> BR
	249 <sup>2</sup>	Tibau – RN	Mandioca	<i>B. tabaci</i> B
	64 <sup>3</sup>	Mançuba - BA	Abóbora	<i>B. tabaci</i> B
	75 <sup>3</sup>	Goiânia - GO	Pepino	<i>B. tabaci</i> B
	116 <sup>3</sup>	Limoeiro do Norte - CE	Feijão	<i>B. tabaci</i> B
	126 <sup>3</sup>	Jaboticabal - SP	Berinjela	<i>B. tabaci</i> B
	220 <sup>3</sup>	Juazeiro - BA	Tomate	<i>B. tabaci</i> B
2000 DF	226 <sup>1</sup>	Cenargen - DF	Algodão	<i>B. tabaci</i> BR
	249 <sup>2</sup>	Tibau – RN	Mandioca	<i>B. tabaci</i> B
	263 <sup>3</sup>	Planaltina - DF	Berinjela	<i>B. tabaci</i> B
	264 <sup>3</sup>	Planaltina - DF	Tomate	<i>B. tabaci</i> B
	265 <sup>3</sup>	Planaltina - DF	Pepino	<i>B. tabaci</i> B
	266 <sup>3</sup>	Planaltina - DF	Abóbora	<i>B. tabaci</i> B
	288 <sup>4</sup>	Cenargen - DF	Tomate	<i>B. tabaci</i> B
	289 <sup>4</sup>	Cenargen - DF	Abóbora	<i>B. tabaci</i> B
290 <sup>4</sup>	Cenargen - DF	Feijão	<i>B. tabaci</i> B	
2001 DF	226 <sup>1</sup>	Cenargen - DF	Algodão	<i>B. tabaci</i> BR
	249 <sup>2</sup>	Tibau – RN	Mandioca	<i>B. tabaci</i> B
	02 <sup>4</sup>	Cenargen - DF	Tomate	<i>B. tabaci</i> B
	03 <sup>4</sup>	Cenargen - DF	Abóbora	<i>B. tabaci</i> B
	04 <sup>4</sup>	Cenargen - DF	Feijão	<i>B. tabaci</i> B
	18 <sup>3</sup>	Planaltina - DF	Tomate	<i>B. tabaci</i> B
	19 <sup>3</sup>	Planaltina - DF	Pepino	<i>B. tabaci</i> B
	20 <sup>3</sup>	Planaltina - DF	Berinjela	<i>B. tabaci</i> B

1 Biótipo BR de *B. tabaci* usado como padrão;

2 Biótipo B de *B. tabaci* usado como padrão;

3 Populações coletadas em campo;

4 Populações coletadas em casa de vegetação no CENARGEN.

Em relação aos indivíduos coletados no ano de 2000, tanto em casa de vegetação quanto em campo, predadores de culturas de abóbora e tomate, não houve uma diferença significativa nos padrões de DNA quando amplificados com o *primer* OPA-13 (Figura 10).

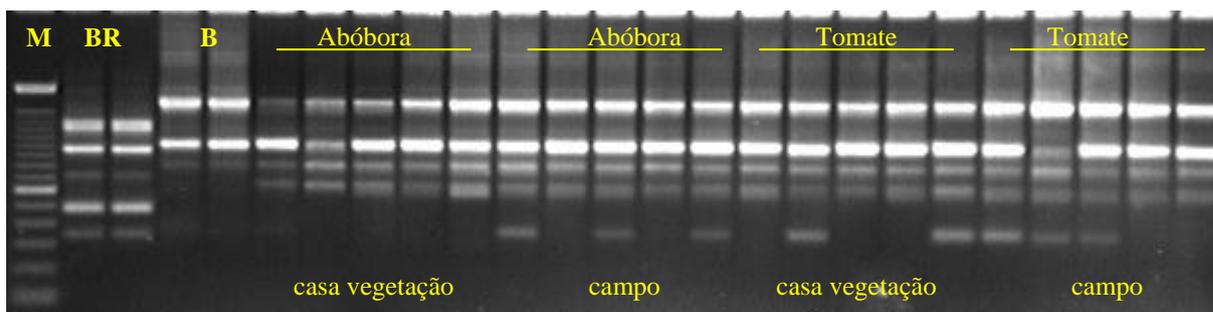


Figura 10 – Análise dos fragmentos de DNA, de amostras coletadas em 2000, obtidos de amplificação com o primer OPA-13. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder. As letras BR e B correspondem aos biótipos BR e B de *B. tabaci* usados como padrão de identificação.

O mesmo resultado foi observado quando utilizou-se o *primer* OPA-13 nas reações de amplificação de RAPD para as amostras coletadas em tomate, tanto em campo quanto em casa de vegetação, no ano de 2001 (Figura 11).

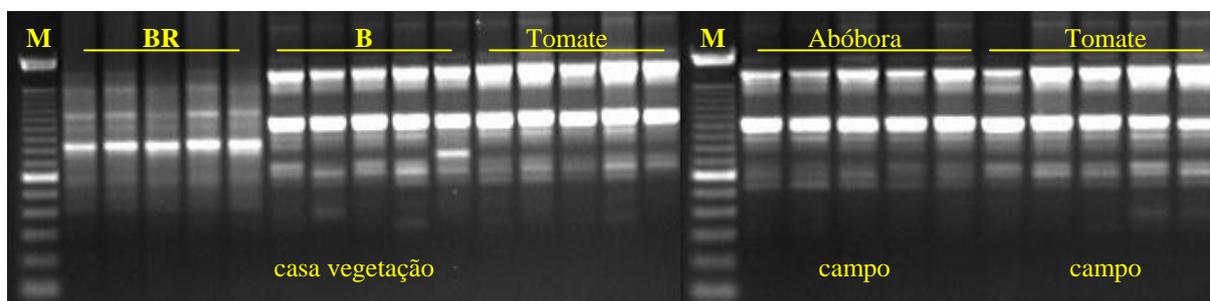


Figura 11 – Análise dos fragmentos de DNA, de amostras coletadas em 2001, obtidos de amplificação com o primer OPA-13. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder. As letras BR e B correspondem aos biótipos de *B. tabaci* usados como padrão de identificação.

Os padrões de comparação para abóbora não puderam ser obtidos para o ano de 2001, pois não foi possível coletar indivíduos nessa cultura em campo no referido período.

Utilizando-se o *primer* OPA-15, detectou-se diferenças entre as populações coletadas em tomate e berinjela em 2000 (Figura 12).

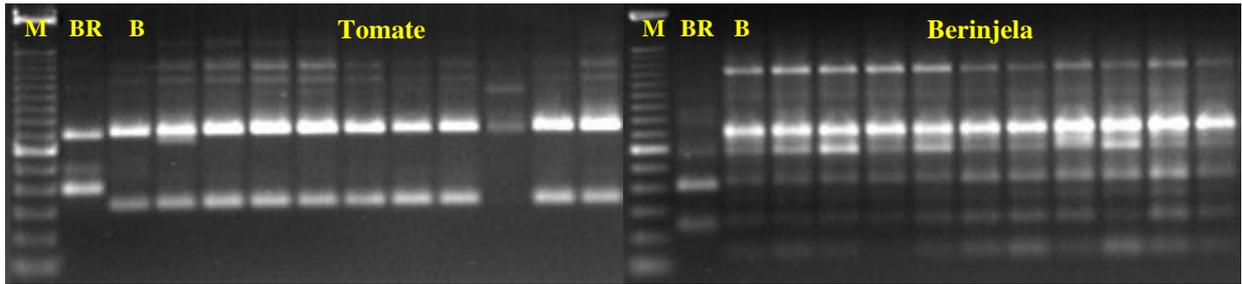


Figura 12 - Análise dos fragmentos de DNA de mosca branca, obtidos de amplificação com o primer OPA-15 a partir de populações coletadas no ano de 2000, em tomate e em berinjela. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder. As letras BR e B correspondem aos biótipos de *B. tabaci* usados como padrão de referência.

Entretanto, a análise molecular dessas mesmas amostras, coletadas em 2001, não permitiu observar diferenças no padrão de bandeamento quando utilizou-se o mesmo *primer* (Figura 13).

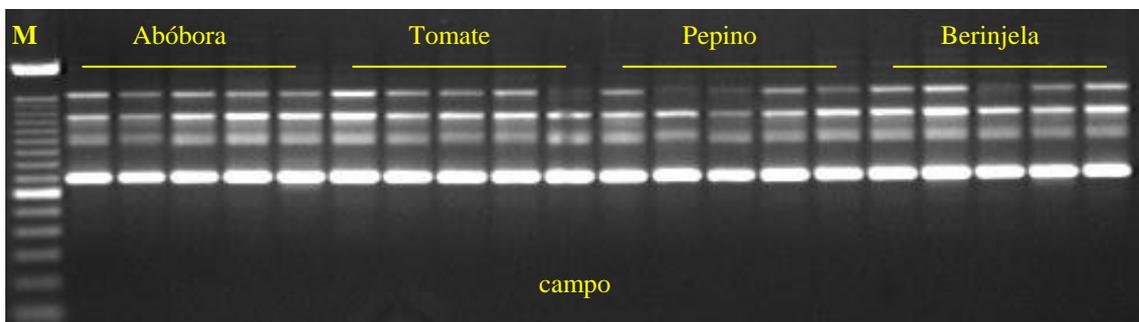


Figura 13 - Análise dos fragmentos de DNA de mosca branca, obtidos de amplificação com o primer OPA-15 em populações coletadas em campo no ano de 2001, tanto em tomate quanto em berinjela. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder. As letras BR e B indicam os biótipos de mosca branca usados como referência.

Os padrões de bandas obtidos pelas populações de mosca branca coletadas em 2000 produziram 2 agrupamentos principais: 1) o agrupamento **A**, sendo formado apenas pelas populações de *B. tabaci* biótipo BR coletadas em algodão e; 2) o agrupamento **B**, constituído apenas pelas populações de *B. tabaci* biótipo B, coletadas em mandioca, abóbora, pepino, feijão, berinjela e tomate (Figura 14).

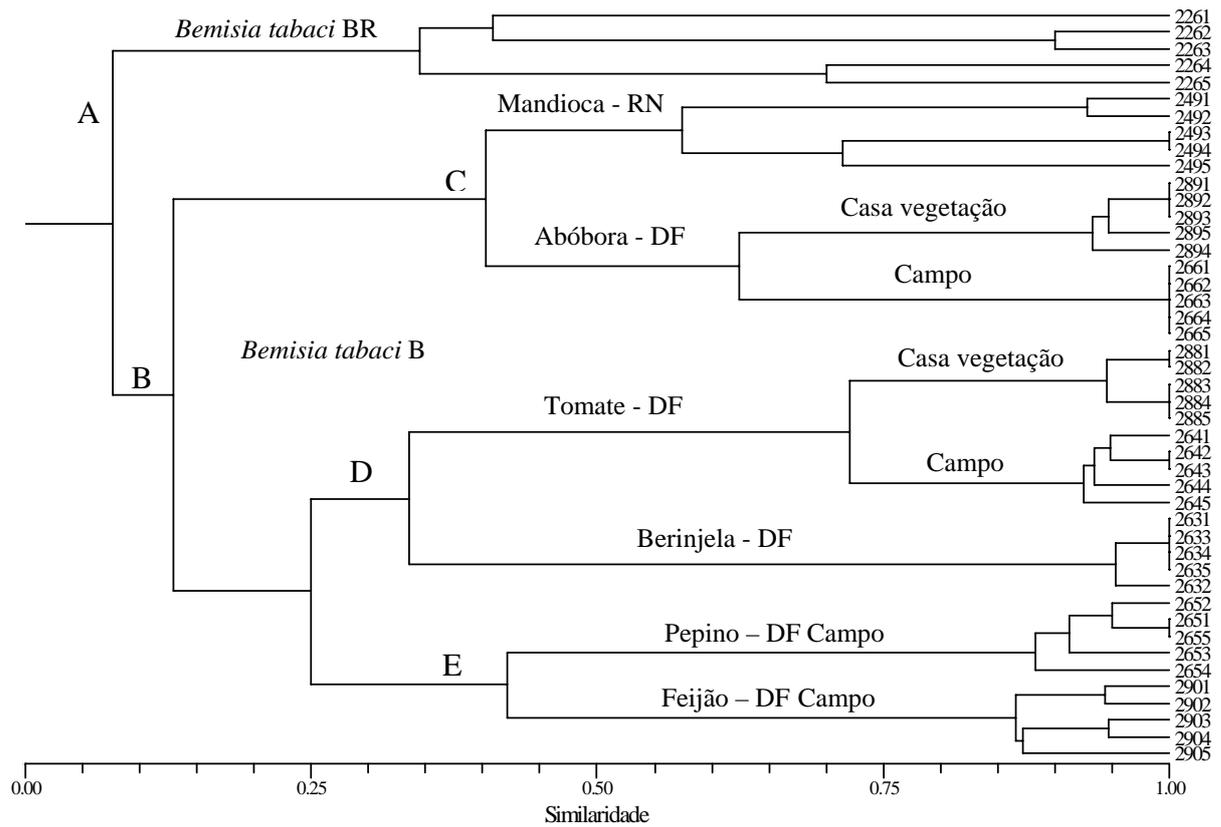


Figura 14 – Análise das populações de *B. tabaci* coletadas no ano de 2000 em culturas mantidas tanto em casa de vegetação quanto em campo.

O agrupamento **E** ficou constituído pelas populações de mosca branca presentes em culturas de feijão e pepino que apresentaram uma similaridade genética de 43 %. Além disso, observou-se que as populações do agrupamento **D** presentes em culturas de berinjela e tomate apresentaram um grau de similaridade em torno de 33 %. Por sua vez, esses dois agrupamentos apresentaram similaridade genética de 25 %.

Pela análise do dendrograma, observou-se que o agrupamento **C** foi constituído pelas populações coletadas em abóbora e mandioca. Essas duas populações apresentaram 12,5 % de similaridade genética em relação aos agrupamentos **D** e **E**. A amostra coletada em abóbora apresentou relação filogenética mais próxima com a população coletada em mandioca, originária do RN, apresentando grau de similaridade de 40 % e mostrando-se diferente em relação às demais populações que foram coletadas na região de Planaltina (DF).

Observou-se também diferenças entre os indivíduos coletados em culturas mantidas tanto em casa de vegetação quanto em campo. As populações coletadas em abóbora (campo e casa de vegetação) apresentaram um grau de similaridade em torno de 65 %. Para as populações coletadas em tomate, sob as mesmas condições, observou-se similaridade em torno de 75 %. O dendrograma revelou que a população de *B. tabaci* biótipo **BR** (agrupamento **A**) apresentou menor grau de similaridade em relação às demais populações analisadas nesse estudo (10 %).

Os dados binários, gerados pelos perfis de marcadores moleculares obtidos pelo uso dos *primers* de RAPD, foram usados na análise de variância molecular (AMOVA). Por meio da comparação de todas as populações de *B. tabaci* biótipos **B** e **BR**, observou-se que 92,06 % da fonte de variação genética era originária de variações entre as populações e que, 7,94 % era proveniente de variações dentro das populações. Comparando-se as populações coletadas em tomate e abóbora tanto em campo quanto em casa de vegetação, observou-se uma variação de: 73,89 % entre populações dentro dos grupos; 23,08 % entre os grupos; e 3,04 % dentro das populações. A seguir, fazendo-se uma comparação entre todas as populações coletadas em campo e em casa de vegetação, observou-se uma variação de: 76,58 % entre populações dentro dos grupos; 18,50 % entre os grupos; e 4,92 % dentro das populações.

As informações de variância molecular refletem resultados semelhantes aos das análises de populações de mosca branca coletadas em várias culturas em várias regiões do Brasil, ou seja, o fator cultura e localidade não influenciam na separação das populações. Sendo assim, foi proposta nova coleta de populações na região do Distrito Federal para a confirmação dos resultados anteriormente descritos.

A análise das populações coletadas em 2001, revelou diferenças em relação à análise do ano anterior. Observou-se que as populações de *B. tabaci* biótipo **B** formaram dois agrupamentos: o agrupamento **A**, formado pela população de *B. tabaci* biótipo **BR**; e o agrupamento **B**, formado pelas populações de *B. tabaci* biótipo **B** coletadas tanto em campo quanto em casa de vegetação, em culturas de mandioca, tomate, feijão, abóbora, pepino e berinjela (Figura 15).

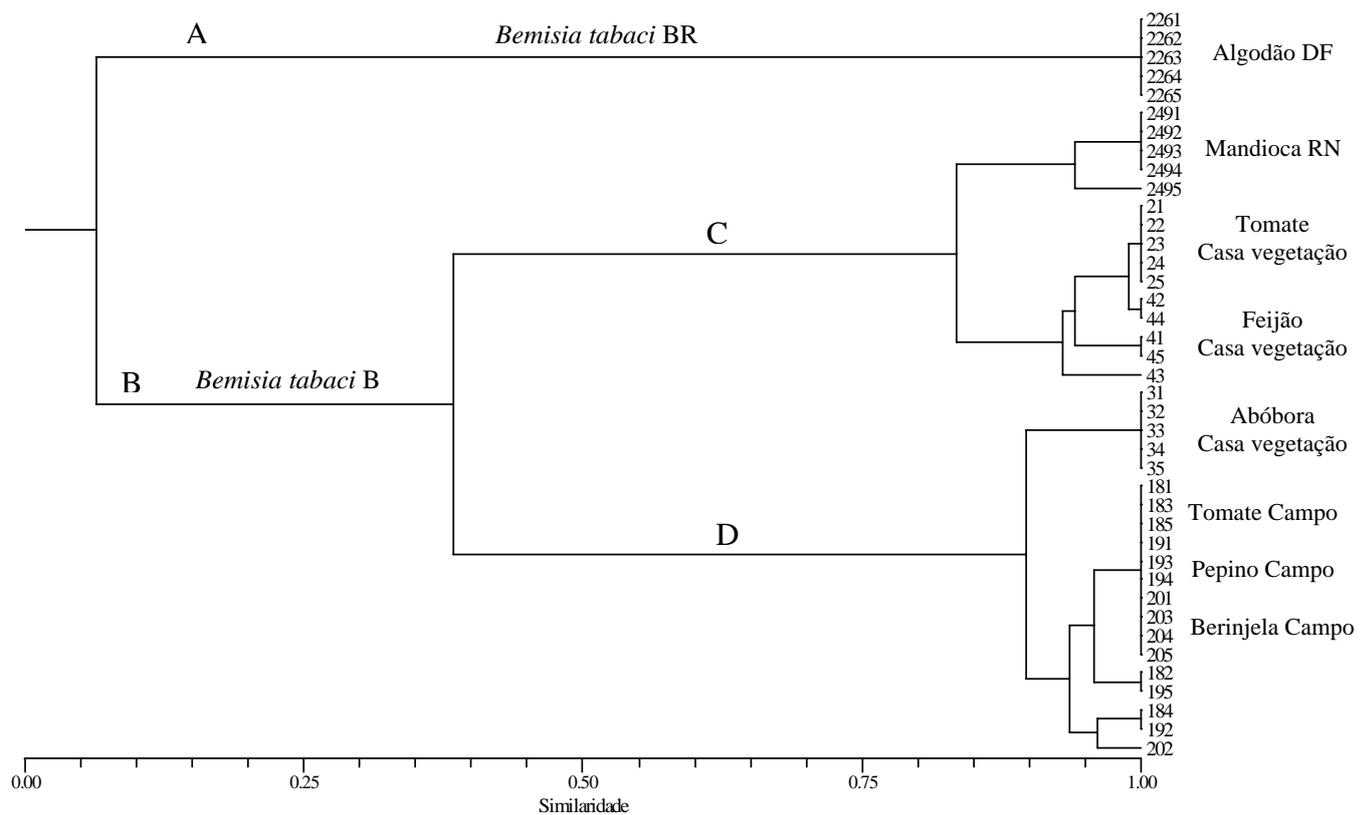


Figura 15 – Análise das populações de *Bemisia* coletadas no ano de 2001 em culturas mantidas tanto em casa de vegetação quanto em campo.

Nesse estudo, mais uma vez, confirmou-se que a população de *B. tabaci* biótipo BR, apresentou baixa similaridade genética (5 %) em relação às amostras de *B. tabaci* biótipo B utilizadas, formando um clado em separado (agrupamento A).

Para o agrupamento B, foram identificadas duas divisões (C e D). Na divisão C, as populações coletadas em tomate e feijão, ambas provenientes de casa de vegetação, apresentaram similaridade em torno de 94 %. Essas populações coletadas em casa de vegetação formaram um grupo único e apresentaram 83 % de similaridade com a população coletada em mandioca originária do RN. Na divisão D, as populações coletadas em tomate, pepino e berinjela, coletadas em campo, apresentaram similaridade em torno de 96 %, formando um grupo único. Esse resultado apresentou-se diferente de todas as análises que foram realizadas, uma vez que, o padrão que parecia estar estabelecido era o de separação das populações do biótipo B de *B. tabaci* em função do tipo cultura. Além disso, os indivíduos coletados em cultura de abóbora mantida em casa de vegetação,

apresentaram similaridade de 89 % com as culturas coletadas em campo, agrupando-se com estas populações.

Em seguida, realizou a análise de variância molecular (AMOVA) para a determinação das fontes de variação observadas no dendrograma. Dos resultados obtidos pela AMOVA, quando todas as populações foram analisadas em conjunto, determinou-se que 96,66 % da fonte de variação observada era proveniente de variações entre as populações analisadas e que 3,34 % era de variações dentro das populações. Comparando-se os principais agrupamentos (**A**, **C** e **D**), observou-se que a variação era devida a: 52,85 % entre populações dentro dos grupos; 44,28 % entre os grupos e 2,86 % dentro das populações. Analisando-se apenas as populações de *B. tabaci* biótipo B (agrupamentos **C** e **D**) determinou-se que a variação era devida a: 83,75 % entre populações dentro dos grupos; 11,05 % entre os grupos; e 5,20 % dentro das populações. Comparando-se as populações coletadas tanto em campo quanto em casa de vegetação, a variação genética observada foi de: 85,76 % entre populações dentro de grupos; 8,99 % entre os grupos; e 5,24 % dentro das populações. Dos resultados da AMOVA, confirmou-se, mais uma vez, que a variabilidade genética encontrada entre as populações não era influenciada pela cultura, localidade de coleta ou ano. Esse resultado é válido mesmo considerando-se o caso das populações do agrupamento **D**.

Em função dos resultados encontrados entre as populações de *B. tabaci* biótipo B coletadas no Distrito Federal, realizou-se mais uma análise utilizando-se, agora, populações de várias localidades do Brasil coletadas em culturas ao longo do ano de 1999 para o estabelecimento de padrões de comparação. Os resultados revelaram a formação de dois agrupamentos: 1) o primeiro (agrupamento **A**), foi constituído pela população de *B. tabaci* biótipo BR e; 2) o segundo (agrupamento **B**), foi constituído por populações de *B. tabaci* biótipo B coletadas em abóbora, feijão, pepino, berinjela, tomate e mandioca (Figura 16).

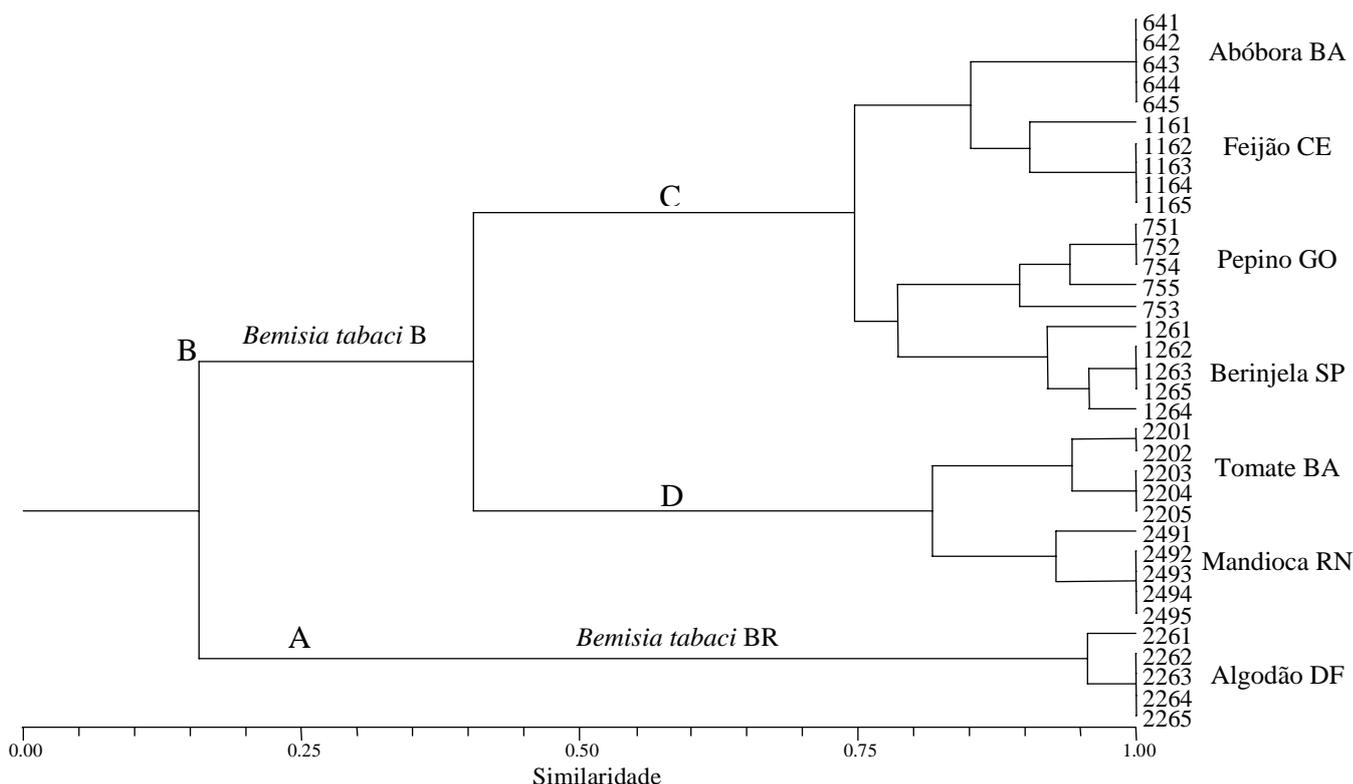


Figura 16 – Análise das populações de *Bemisia* coletadas em culturas originárias de várias localidades do Brasil ao longo do ano de 1999.

A análise do dendrograma revelou que o biótipo BR de *B. tabaci* apresentou o menor índice de similaridade em relação às demais populações analisadas (16 %), formando um agrupamento à parte. Para as populações de *B. tabaci* biótipo B foram identificados dois agrupamentos (C e D). No agrupamento C, as populações de abóbora e feijão apresentaram 75 % de similaridade em relação às amostras coletadas em pepino e berinjela. As populações de abóbora (BA) e feijão (CE) apresentaram 85 % de similaridade e, as populações de pepino (GO) e berinjela (SP), apresentaram similaridade de 78 %. No agrupamento D, observou-se que a similaridade das populações de tomate (BA) e mandioca (RN) foi de 82 %. O dendrograma revelou que as populações provenientes de estados da região nordeste formaram dois grupos distintos, enquanto as populações do Cento-Oeste e Sudeste formam um grupo único. A análise do dendrograma sugere também uma possível separação das populações em função do tipo de cultura.

Dessa forma, os dados obtidos a partir dessas populações foram submetidos a análise de variância molecular (AMOVA). Fazendo-se a comparação entre todas as populações do estudo, observou-se que a variação era devida a: 95,69 % entre as

populações e 4,31 % dentro das populações. Considerando-se apenas as populações do biótipo B de *B. tabaci* observou-se que a variação era devida a 95,26 % entre as populações e 4,74 % dentro das populações. Com esses resultados, confirmou-se que a variabilidade observada entre as populações de *B. tabaci* está correlacionada, provavelmente, com a estratégia de reprodução adotada por essa espécie. Soma-se a esses fatos, a ampla variabilidade genética que é encontrada dentro dessa espécie de aleirodídeo.

A análise dos dendrogramas permitiu destacar algumas características, dentre as quais:

- O biótipo BR de *B. tabaci* apresentou baixa similaridade em todas as análises, variando de 10 % a 15 %, em relação ao biótipo B;

- A comparação das populações coletadas em mandioca e tomate, tanto no monitoramento realizado em 2001 quanto na análise das populações coletadas no Brasil, revelou um grau de similaridade variando de 80 % a 85 %;

- O monitoramento de 2000 e 2001 indicou que as populações coletadas em berinjela e em tomate apresentaram diferenças no grau de similaridade, variando de 35 % no ano de 2000 para 90 % em 2001. A análise das populações coletadas em 1999 no Brasil, revelou que estas duas populações apresentam-se em agrupamentos distintos;

- A comparação das populações coletadas em mandioca e tomate, no monitoramento de 2001 e no estudo realizado nas populações ao longo de 1999, revelou que estas apresentaram variação de 80 % a 85 % no grau de similaridade;

- A análise das populações coletadas em berinjela e pepino, indicou uma similaridade de 80 % nas populações coletadas em 1999 e de 99 % no monitoramento realizado em 2001;

- No monitoramento realizado em 2001, observou-se que as populações coletadas em campo formaram um agrupamento único;

- Na análise das populações de 1999, observou-se que aquelas amostras coletadas na região nordeste formaram grupos distintos em relação àquelas coletadas no Centro-Oeste e Sudeste.

- A variação observada nos monitoramentos pode ser devida às alterações climáticas ocorridas no mês de agosto, tanto em 2000 (quente e seco) quanto em 2001 (frio e chuvoso).

- Os resultados quando organizados em um dendrograma sugerem que as populações de um mesmo biótipo podem se agregar de acordo com a cultura predada. Contudo, por meio da análise de variância molecular (AMOVA), observou-se que a fonte

de variabilidade estava relacionada a variações entre as populações do que em relação a variações dentro das populações.

Utilizando padrões de esterase, Liu *et al.* (1992) observaram que populações de *B. tabaci* biótipo B coletadas em culturas de poinsetia e hibisco estabelecidas nos Estados Unidos apresentaram perfis idênticos de isoenzimas, indicando que esses padrões isoenzimáticos não eram influenciados pela cultura vegetal hospedeira.

Entretanto, Wool *et al.* (1994) a partir dos padrões de esterase obtidos de populações de *B. tabaci* coletadas em diferentes regiões geográficas da Colômbia, sugeriram que esta espécie de aleirodídeo não era uma entidade genética única, ou seja, por meio dos padrões de isoenzimas, as moscas brancas da Colômbia eram diferenciadas geograficamente. Os autores apresentam a definição de raças geográficas para melhor definir essa característica revelada pelas isoenzimas.

Em 2001, Moya *et al.* por meio de marcadores moleculares RAPD e fazendo a análise de variância determinaram que os biótipos contribuem significativamente mais para a variabilidade observada do que as populações dentro de um mesmo biótipo, ou seja, o fluxo gênico entre dois biótipos de uma mesma população é menor do que entre populações de biótipos idênticos.

Independentemente dos eventos que influenciam a distribuição das populações de *B. tabaci*, a técnica de RAPD demonstrou-se sensível o bastante para revelar flutuações ocorridas nas populações ao longo de um ano. Com isso, as técnicas moleculares baseadas em DNA mostram-se úteis para confirmar a existência de biótipos e avaliar o grau de separação entre estes. Para propósitos epidemiológicos e agro-econômicos, torna-se essencial entender a íntima relação que se desenvolve entre as populações locais de *B. tabaci* e, especialmente, qualquer diferenciação entre populações que estejam relacionadas com o hospedeiro (Burban *et al.*, 1992).

Estas informações poderão servir de base para maiores estudos visando identificar quais fatores influem na distribuição das populações em uma dada área, como também, poderão ser úteis na determinação de métodos de controle químico da mosca-branca em relação a uma cultura hospedeira específica. Passa a ser de grande importância a obtenção de informações a respeito das fontes de variação que ocorrem dentro do biótipo B de *B. tabaci*, uma vez que, populações resistentes de mosca branca podem ser selecionadas com relativa facilidade após a aplicação de inseticidas químicos. Maiores estudos precisam ser realizados para se obter dados que possam ser aplicados na identificação destas populações específicas de mosca branca.

## ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE OS BIÓTIPOS DE *B. tabaci*

Para as análises genéticas das populações *B. tabaci*, fêmeas adultas pertencentes aos seus vários biótipos, incluindo Q e cassava, tiveram os seus padrões de bandas determinados, por RAPD, com os primers OPA-04, OPA-10, OPA-11, OPA-13 e OPA-15.

Para todos os biótipos usados no estudo, incluindo aqueles provenientes de localidades fora do Brasil, o volume de tampão de extração de DNA foi o mesmo já estabelecido para as populações de *B. tabaci* biótipos B e BR. Uma vez determinadas as condições de extração de DNA dos diversos biótipos, estes tiveram seus padrões de bandeamento comparados com outras populações presentes no banco de mosca branca, para fins de identificação por meio molecular. Observou-se diferenças entre os padrões eletroforéticos obtidos para os biótipos de *B. tabaci* (Figura 17).

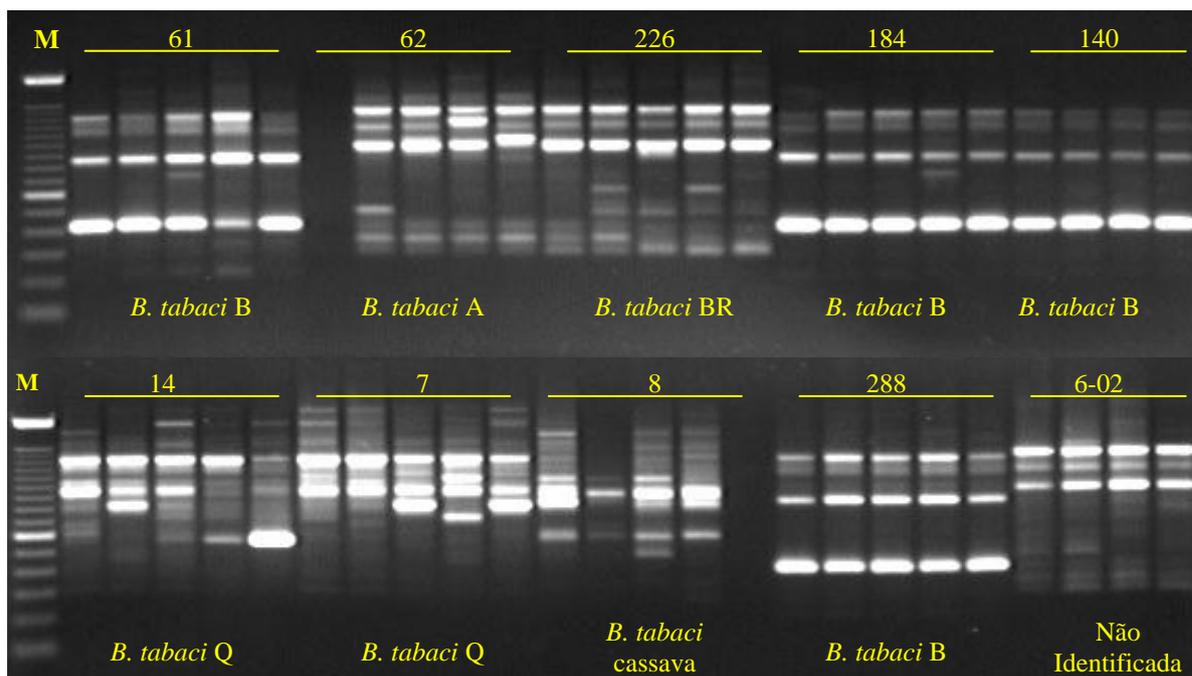


Figura 17 - Análise dos fragmentos de DNA dos vários biótipos de *B. tabaci* obtidos de amplificação com o primer OPA-10. A letra M indica o marcador 100 pb ladder. Os números acompanhados das barras indicam o número de indivíduos pertencentes àquele código do banco de alelodídeos que foram analisados.

A análise das amostras com o *primer* OPA-04, revelou diferenças entre os vários biótipos. Com relação ao biótipo Q, foram identificadas bandas de 550 pb e 900 pb que não são correspondentes nos demais biótipos de *B. tabaci*. Possivelmente, esse *primer* poderá ser usado na identificação molecular desse biótipo. Por sua vez, o biótipo cassava apresentou um forte sinal de amplificação de 950 pb. Apenas o biótipo BR possui uma banda de massa molecular de valor aproximado, em torno de 950 pb, quando se usa esse *primer*. A análise com o *primer* OPA-10 indicou grande polimorfismo na faixa de 600 pb a 1300 pb para o biótipo Q. Além disso, esse biótipo apresentou diferença em relação ao biótipo B, pela ausência de sinal de amplificação na faixa de 450 pb. O biótipo cassava apresentou polimorfismo na faixa de 500 pb a 1100 pb em relação às demais amostras analisadas. O uso do *primer* OPA-11 nas reações de amplificação produziu uma banda característica para o biótipo Q na faixa de 750 pb. O biótipo cassava apresentou sinal de amplificação em torno de 550 pb. Ambos os biótipos não apresentaram as bandas de 350 pb e 500 pb características dos biótipos B e BR, respectivamente. Observou-se, também, diferenças entre os biótipo Q e cassava, quando utilizou-se o *primer* OPA-13. O uso deste *primer* permitiu identificar uma banda extra (superior a 1900 pb) no biótipo cassava que não apresenta correspondência no biótipo Q. Além disso, esse *primer* produziu um polimorfismo muito similar entre esses dois biótipos e o biótipo B. Em relação ao biótipo BR, notou-se a ausência de banda na região correspondente a 850 pb. Com o *primer* OPA-15, observou-se uma banda comum, de 700 pb, entre os biótipos Q, B e BR. Entretanto, o biótipo cassava apresentou uma banda em torno de 800 pb, diferenciando-se dos demais padrões. Esse *primer* poderá ser então usado para a identificação do biótipo cassava.

Uma vez estabelecida a identificação molecular dos biótipos de mosca branca por RAPD, poderão ser realizados estudos destas populações. Os resultados obtidos poderão ser utilizados para a determinação das relações filogenéticas entre biótipos de importância econômica.

A análise dos perfis eletroforéticos produzidos pelos biótipos de *B. tabaci*, permitiu organizar as populações em 3 agrupamentos principais (Figura 18).

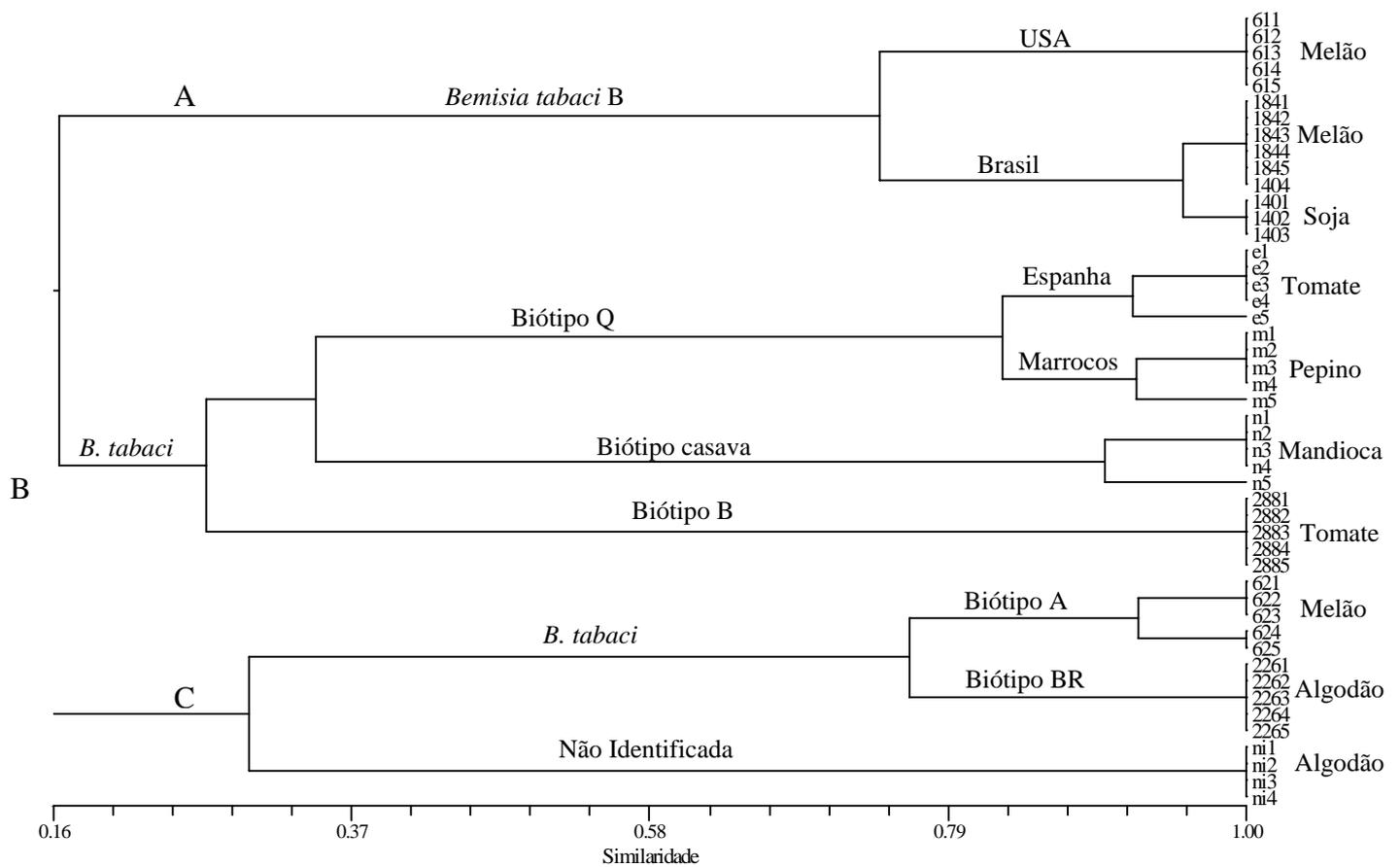


Figura 18 – Análise de populações dos vários biótipos de *B. tabaci* presentes no Brasil e em outros países.

O agrupamento **A** foi constituído pelo biótipo B que apresentou baixa similaridade (16 %) em relação aos demais biótipos de *B. tabaci*. A análise revelou ainda que o biótipo **B** dos Estados Unidos apresentou similaridade de 79 % em relação ao mesmo biótipo coletado em culturas no Brasil. Além disso, as populações, de *B. tabaci* B, coletadas em melão e soja no Brasil apresentaram, aproximadamente, 95 % de similaridade genética.

Para o agrupamento **B**, observou-se que as duas populações do biótipo Q apresentaram 83 % de similaridade entre si e 37 % em relação ao biótipo cassava. Além disso, uma população do biótipo B de *B. tabaci*, coletada em cultura de tomate no Brasil, apresentou maior similaridade com aqueles dois biótipos do que com populações do mesmo biótipo coletadas no Brasil.

O agrupamento **C** foi constituído pelas populações de *B. tabaci* pertencentes aos biótipos A e BR. Estas duas populações de mosca branca apresentaram similaridade genética em torno de 79 %. Além disso, uma população não identificada, coletada em

cultura de algodão no Mato Grosso, apresentou maior similaridade com os biótipos A e BR. Uma possibilidade seria de que esta população constitua uma variante do biótipo BR. Contudo, experimentos envolvendo o cruzamento entre estes biótipos precisam ser realizados para a confirmação dessa suposição.

A análise de AMOVA utilizando todos os biótipos de *B. tabaci* indicou que a fonte de variação era proveniente de: 96,22 % entre as populações e 3,78 % de dentro das populações. A seguir, fazendo-se a comparação entre os três agrupamentos observou-se que 56,95 % da variação era proveniente dentro os grupos, 39,84 % entre populações dentro dos grupos e 3,21 % de dentro das populações. Esse último resultado pode ser devido ao fato de que os biótipos B e Q compartilham uma maior similaridade genética sendo, também, descrita a ocorrência de formação de híbridos B/Q resultantes de cruzamentos entre esses dois biótipos (Ronda *et al.*, 1999).

Em 2001, Moya *et al.* por meio de marcadores moleculares RAPD e fazendo a análise de variância determinaram que os biótipos contribuem significativamente mais para a variabilidade observada do que as populações dentro de um mesmo biótipo, ou seja, o fluxo gênico entre dois biótipos de uma mesma população é menor do que entre populações de biótipos idênticos.

Um estudo da distribuição de biótipos na Península Ibérica, revelou a presença de dois biótipos: B e Q. Na Espanha, ambos os biótipos coexistem na mesma área, sendo que o biótipo Q é o predominante. Eles diferem em várias características biológicas como: período de desenvolvimento, preferência por hospedeiro e eficiência na transmissão de vírus. O biótipo Q também foi encontrado em Marrocos. Em virtude do potencial do biótipo Q se tornar uma praga tão prejudicial quanto o biótipo B, surge a necessidade de uma contínua vigilância para se evitar a disseminação daquele no Mediterrâneo e em outras regiões do mundo. Além disso, a riqueza de interações entre os biótipos de *B. tabaci* e os vírus que eles transmitem, determinam a importância dos estudos de genética das populações de mosca branca de forma a melhor se entender a epidemiologia dessas viroses (Moya *et al.*, 2001).

Uma vez que os perfis eletroforéticos foram determinados para os biótipos de *B. tabaci*, estas informações poderão ser usadas em trabalhos futuros de identificação, monitoramento e dispersão destes biótipos de expressão quarentenária. Além disso, maiores estudos poderão ser realizados para se estabelecer as relações entre a biologia e a genética destas populações de aleirodídeos.

## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE ALEIRODÍDEOS

Indivíduos de várias populações de artrópodos incluindo um inseto exótico, a mosca negra (*Aleurocanthus woglumi*), tiveram seus padrões de bandas determinados com os *primers* OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-10, OPA-11, OPA-13, OPA-15, OPA-17 OPA-20 e OPR-06 e comparados com os perfis de marcadores moleculares já determinados para os biótipos de B e BR de *B. tabaci*.

Para a análise da mosca negra (*Aleurocanthus woglumi*), foi estabelecido um protocolo de extração de DNA, uma vez que, para as demais amostras usadas no experimento, inclusive *B. tabaci* biótipos B e BR, o volume de tampão de extração de DNA foi de 60 µL. No caso da mosca negra, determinou-se um volume de 300 µL de tampão de extração de DNA. Uma vez determinadas as condições de extração de DNA da mosca negra, esta teve seu padrão de bandejamento comparado com outras populações presentes no banco de aleirodídeos, para fins de identificação por meio molecular. Observou-se que os perfis eletroforéticos obtidos para as diversas populações de artrópodos apresentaram diferenças em relação aos biótipos de *B. tabaci* (Figura 19).

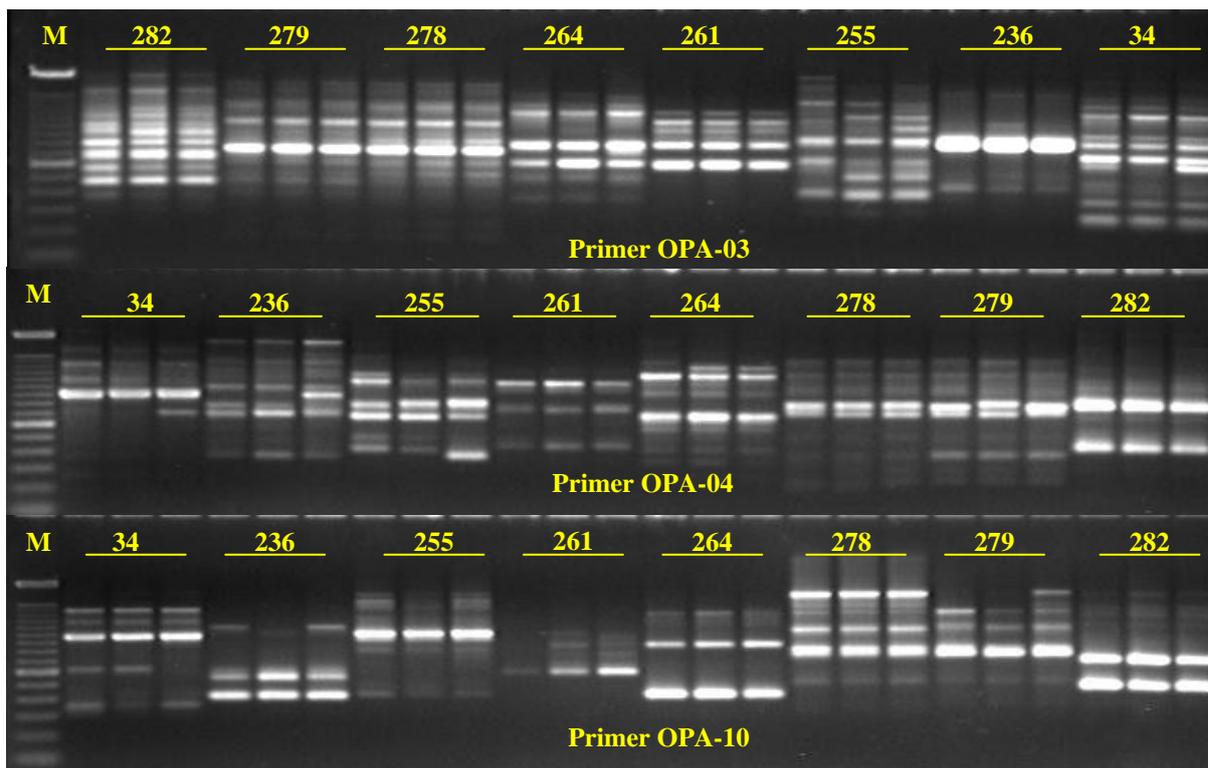


Figura 19 - Análise dos fragmentos de DNA de várias populações de aleirodídeos, obtidos de amplificação com os primers OPA-03, OPA-04 e OPA-10. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder. Os códigos indicam: 34, *Bemisia tabaci* biótipo BR; 236, *B. tuberculata*; 255, *Aleurothrixus aepim*; 261, *Aleurodicus cocois*; 264, *B. tabaci* biótipo B; 278, *Aleurocanthus woglumi*; 279, *A. woglumi*; 282, *Trialeurodes vaporariorum*. As barras indicam o número de indivíduos analisados.

Utilizando-se os perfis de fragmentos de DNA obtidos para as populações de mosca negra como padrão de comparação, observou-se que: um forte sinal de amplificação na região de 1000 pb foi obtido com o *primer* OPA-11; com o *primer* OPA-13, um fragmento de massa molecular de 600 pb; utilizando-se o *primer* OPA-10 obteve-se uma banda de massa molecular de 800 pb; já o *primer* OPA-03, amplificou um sinal de amplificação de 750 pb; o *primer* OPA-05 produziu um fragmento de 450 pb não encontrado nas demais amostras; o *primer* OPA-20 produziu bandas de 650 pb e de 1000 pb que não apresentaram correspondência com os biótipos B e BR de *B. tabaci*; o *primer* OPA-15 produziu um fragmento de 950 pb, que poderá ser usado na identificação molecular da mosca negra.

Usando-se o *primer* OPA-11, observou-se que o biótipo BR de *B. tabaci* produziu um fragmento de DNA de 500 pb que também foi encontrado na amostra de *B. tuberculata*. Entretanto, aquele não foi observado na amostra do biótipo B de *B. tabaci*. As reações de amplificação com o *primer* OPA-13 produziram uma banda de 850 pb na amostra do biótipo BR de *B. tabaci*. Esta mesma banda apresentou correspondência nas amostras de mosca negra, mas com fraco sinal de amplificação. O uso deste *primer* permitiu identificar molecularmente os biótipos de *B. tabaci*.

O *primer* OPA-03, por sua vez, produziu um fragmento de 850 pb característico para a identificação de amostras de *Bemisia tuberculata*. Provavelmente, este *primer* poderá ser empregado na identificação molecular daquele inseto.

O uso do *primer* OPA-05 nas reações de RAPD, produziu uma banda característica de 900 pb na amostra de *B. tabaci* biótipo B. Contudo, para as amostras de *B. tabaci* biótipo BR foram visualizados dois sinais de amplificação de 900 pb e de 1200 pb.

Os biótipos B e BR de *B. tabaci*, assim como, a mosca negra apresentaram padrões distintos de bandeamento utilizando-se o *primer* OPA-04. Além disso, com o uso desse mesmo *primer*, determinou-se um padrão para *Aleurodicus cocois*. A identificação de *Aleurothrixus aepim* também foi possível nas reações de amplificação de RAPD quando utilizou-se o *primer* OPA-10.

Gawel & Bartlett (1993) identificaram os biótipos A e B de *B. tabaci* empregando a técnica de RAPD. Além disso, Haymer (1994) sugere o uso de *primers* de seqüências aleatórias para o estudo de variações genéticas em populações de insetos. Guirao *et al.* (1994) empregaram a técnica de RAPD para a identificação, por meio de diferenças entre os perfis de marcadores moleculares, das espécies de *T. vaporariorum* e *B. tabaci*.

Além da obtenção de perfis moleculares para a identificação de *T. vaporariorum* e *B. tabaci*, outros insetos poderão ser identificados por meio dessa estratégia baseada em DNA como, por exemplo, a mosca negra dos citros *A. woglumi*. Esse inseto é considerado uma praga de nível A1 para o Brasil e outros países do Comitê de Sanidade Vegetal do Cone Sul (COSAVE), principalmente em ralação aos citros e outras frutíferas. Este inseto faz parte do alerta máximo e é considerado uma das pragas que estão na iminência de entrada no país. Sendo assim, de modo a estabelecer critérios para uma identificação rápida e eficiente deste inseto caso ele venha a ser detectado em pontos de entrada do país e ainda visando auxiliar em medidas fitossanitárias necessárias para a erradicação do inseto conforme determinação do DDIV/DAS/MA, padrões moleculares foram estabelecidos para

este inseto, assim como, determinou-se o seu grau de similaridade genética em relação a outras populações de aleirodídeos.

Uma vez estabelecida a identificação molecular das amostras de moscas branca e negra por meio de RAPD, poderão ser realizados estudos destas populações. Os resultados obtidos foram utilizados para a determinação das relações filogenéticas entre estes insetos de importância econômica. A análise dos perfis eletroforéticos, permitiu organizar as populações em 2 agrupamentos principais (Figura 20).

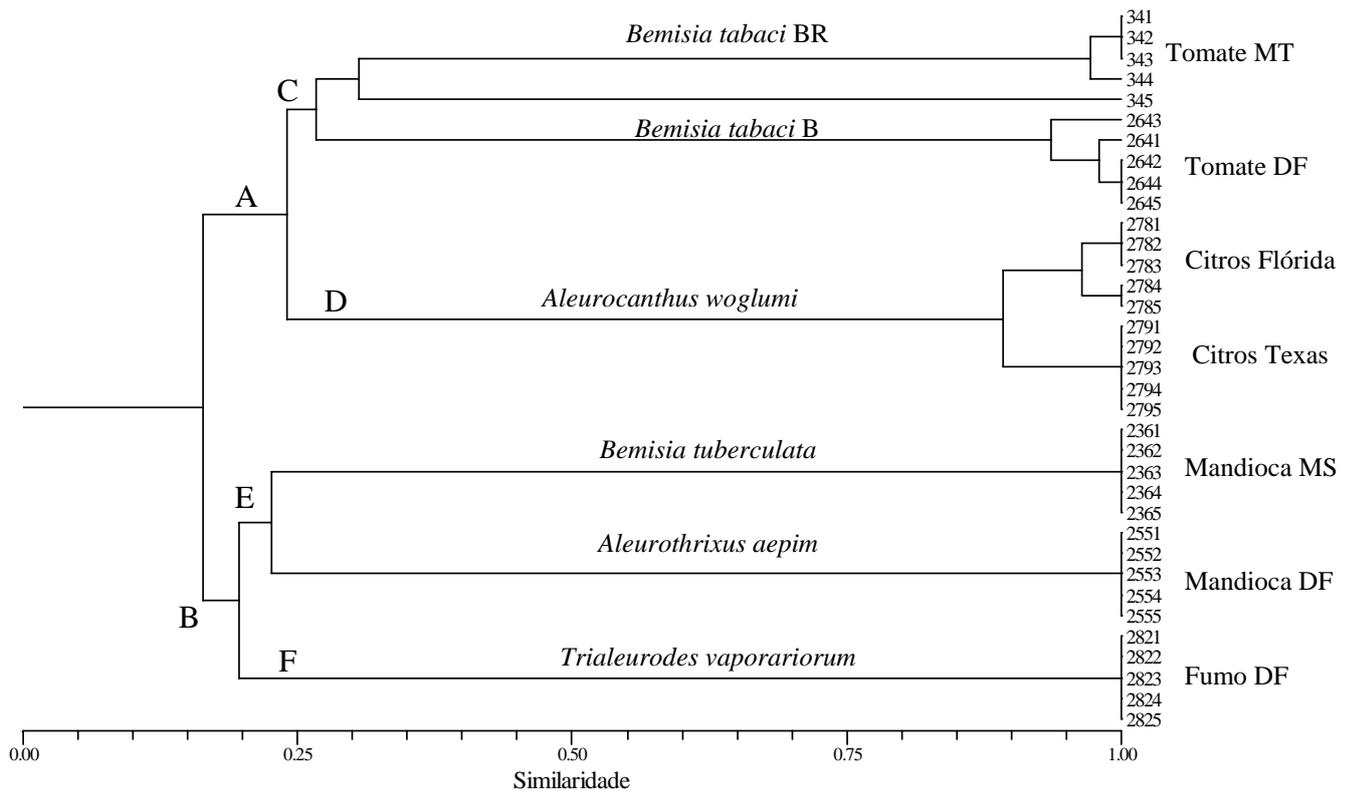


Figura 20 - Análise das populações de aleirodídeos coletadas em diferentes culturas.

Com relação ao primeiro agrupamento (definido com **A**), observou-se que as populações de *B. tabaci* biótipos B e BR, assim como, *A. woglumi*, formaram um agrupamento com 17 % de similaridade em relação às demais populações de aleirodídeos. Dentro desse agrupamento foram encontradas duas divisões (**C** e **D**), sendo que, os biótipos B e BR de *B. tabaci* formaram um grupo único (divisão **C**) apresentando 28 % de similaridade entre si e 25 % em relação às populações de *A. woglumi* (divisão **D**). As duas populações de mosca negra, apresentaram uma relação filogenética de 89 %.

No agrupamento B, observou-se que *B. tuberculata* e *A. aepim*, apresentaram similaridade de 24 % entre as suas populações, formando um grupo único (divisão E). E, em relação à população de *T. vaporariorum*, apresentam um grau de similaridade filogenética de 20 %.

Da análise da distribuição das populações de insetos no dendrograma, observa-se um resultado interessante que está relacionado com o agrupamento das populações em função da cultura predada. Esse padrão foi observado tanto para as populações dos biótipos de *B. tabaci* predando tomate, quanto para *A. woglumi* atacando citros, formando o agrupamento A no dendrograma. As mesmas observações puderam ser feitas para as populações de insetos encontradas no agrupamento B do dendrograma, uma vez que, *B. tuberculata* e *A. aepim* foram encontradas predando culturas de mandioca. Fazendo-se a comparação com o trabalho das populações de aleirodídeos atacando cultura de mandioca, confirmou-se também, nesse trabalho, a baixa similaridade entre estas duas populações. Por fim, a população de *T. vaporariorum* apresentou similaridade em torno de 20 % em relação às populações coletadas em mandioca.

As análises sugerem, mais uma vez, uma possível separação das populações de aleirodídeos em função da cultura predada. Dessa forma, foram conduzidas análises de AMOVA para a determinação das fontes de variação entre as populações desse estudo. Comparando-se os padrões binários produzidos por cada população, observou-se que: 97,75 % da fonte de variação era proveniente de variações entre as populações e 2,25 % de variações dentro das populações de insetos. Comparando-se a influência das culturas na separação das populações no dendrograma observou-se que: 59,47 % da variação era devida a variações entre populações dentro dos grupos, 38,41 % de variações entre os grupos e 2,13 % de variações dentro das populações. Mais uma vez, exclui-se a interferência das culturas sobre o padrão de separação das espécies de artrópodos no dendrograma. Provavelmente, o resultado observado possa ser devido às estratégias reprodutivas de cada espécie, por exemplo, reprodução assexuada gerando populações clonais e, dessa forma, isogênicas. Uma vez determinados os perfis eletroforéticos e as relações filogenéticas das populações de aleirodídeos, estudos poderão ser realizados usando marcadores desenhados especificamente para cada população de inseto buscando-se averiguar quais fatores são determinantes para a escolha de uma dada cultura para predação e para o estabelecimento das populações em uma determinada área.

Por sua vez, foi também possível determinar bandas de DNA candidatas para o desenvolvimento de marcadores moleculares que sejam específicos para os biótipos de *B.*

*tabaci*. Essa praga que foi introduzida no país apresenta-se dispersa na maioria dos estados da federação, provocando prejuízos à produção e causando impactos ao agro-ecossistema.

#### COMPARAÇÃO DE PERFIS DE MARCADORES MOLECULARES ENTRE *B. tabaci* E VÁRIAS ESPÉCIES DE INSETOS DE INTERESSE AGRONÔMICO

Utilizando-se *primers* de RAPD para a obtenção de perfis de marcadores moleculares entre os vários insetos de interesse agronômico, foram observadas diferenças entre os padrões de bandas produzidos pelo biótipo B de *B. tabaci* em relação aos demais insetos analisados (Figura 21).

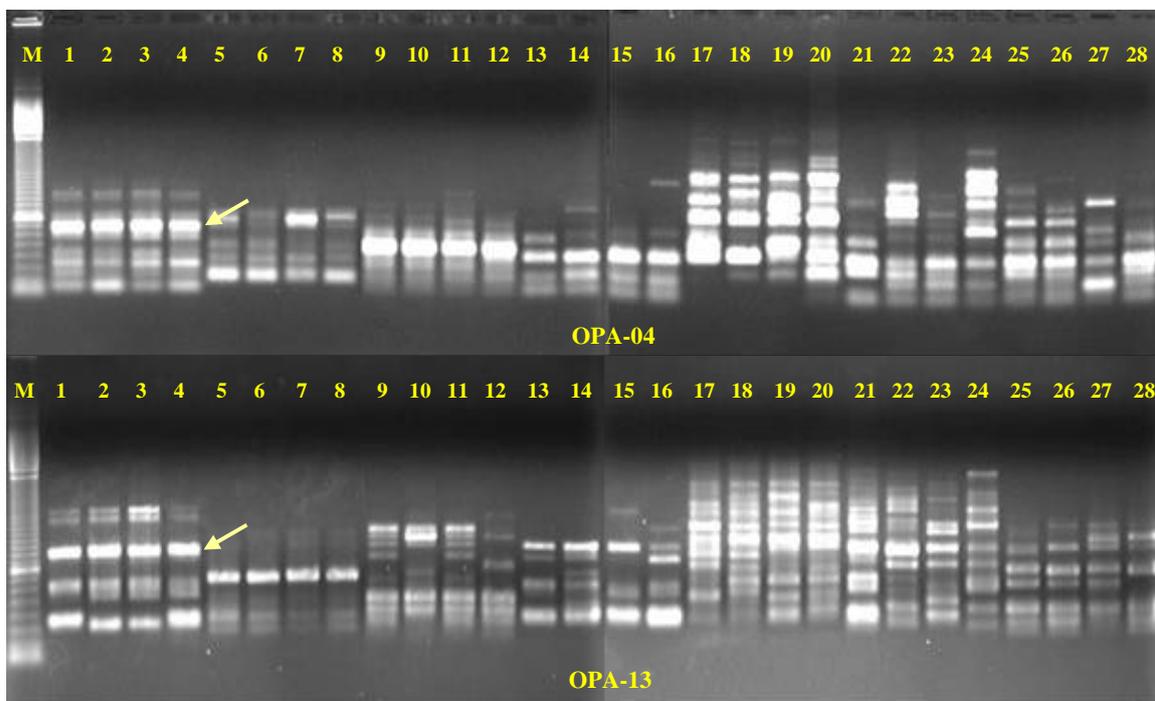


Figura 21 – Perfis de marcadores moleculares gerados pela técnica de RAPD utilizando-se os primers OPA-04 e OPA-13. Os números indicam: 1 a 4, *B. tabaci* biótipo B; 5 a 8, *A. woglumi*; 9 a 12, *Trichogramma*; 13 a 16, *A. grandis*; 17 a 20, *S. frugiperda*; 21 a 24, *A. gemmatalis*; 25 a 28, *N. gemini*. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb Ladder. As setas indicam fragmentos de DNA característicos para a o biótipo B de *B. tabaci*.

Utilizando-se o *primer* OPA-04 nas reações de RAPD foram obtidos diferentes perfis de DNA para cada população de inseto. Observou-se que a população de *Trichogramma* produziu um único e forte sinal de amplificação de 450 pb. Para *A. grandis* obteve-se uma banda de 400 pb. Para *S. frugiperda* identificou-se uma banda característica para essa população de 800 pb. Já a população de *A. gemmatalis* produziu uma banda de 350 pb específica para essa população. Para *N. gemini* obteve-se, também, uma banda de 350 pb. Entretanto, o perfil de fragmentos de DNA para essa população foi diferente se comparado com a população de *A. gemmatalis*. Para *B. tabaci* biótipo B foram identificadas três bandas de DNA de 150 pb, 350 pb e 700 pb. Além disso, observou-se que o perfil eletroforético para esse hemíptero foi diferente se comparado aos perfis de coleópteros, lepidópteros e himenópteros usados nesse estudo.

Utilizando-se o *primer* OPA-13 obteve-se uma banda de DNA de 750 pb característica para *A. woglumi*. Para a população de *Trichogramma* foram obtidas duas bandas características de 450 pb e 550 pb. Já as espécies de lepidópteras apresentaram intenso polimorfismo variando de 300 pb a 1700 pb. Um resultado interessante foi a grande semelhança entre os perfis eletroforéticos do biótipo B de *B. tabaci* e *A. grandis*. A diferença entre estas duas espécies ficou relacionada com a presença de duas bandas de DNA de 1700 pb e 1800 pb que são encontradas apenas na população de *B. tabaci* biótipo B. Por meio da técnica de RAPD foi possível identificar diferenças moleculares entre importantes espécies de insetos de interesse agrônomo. Além disso, a técnica de RAPD revelou possíveis bandas de DNA candidatas à clonagem e ao desenvolvimento de marcadores mais específicos para a detecção de uma determinada espécie de inseto.

Uma vez obtidos os perfis de marcadores de RAPD entre as populações de inseto, estes foram usados para a determinação de um dendrograma para a análise do grau de similaridade entre as espécies analisadas nesse estudo (Figura 22).

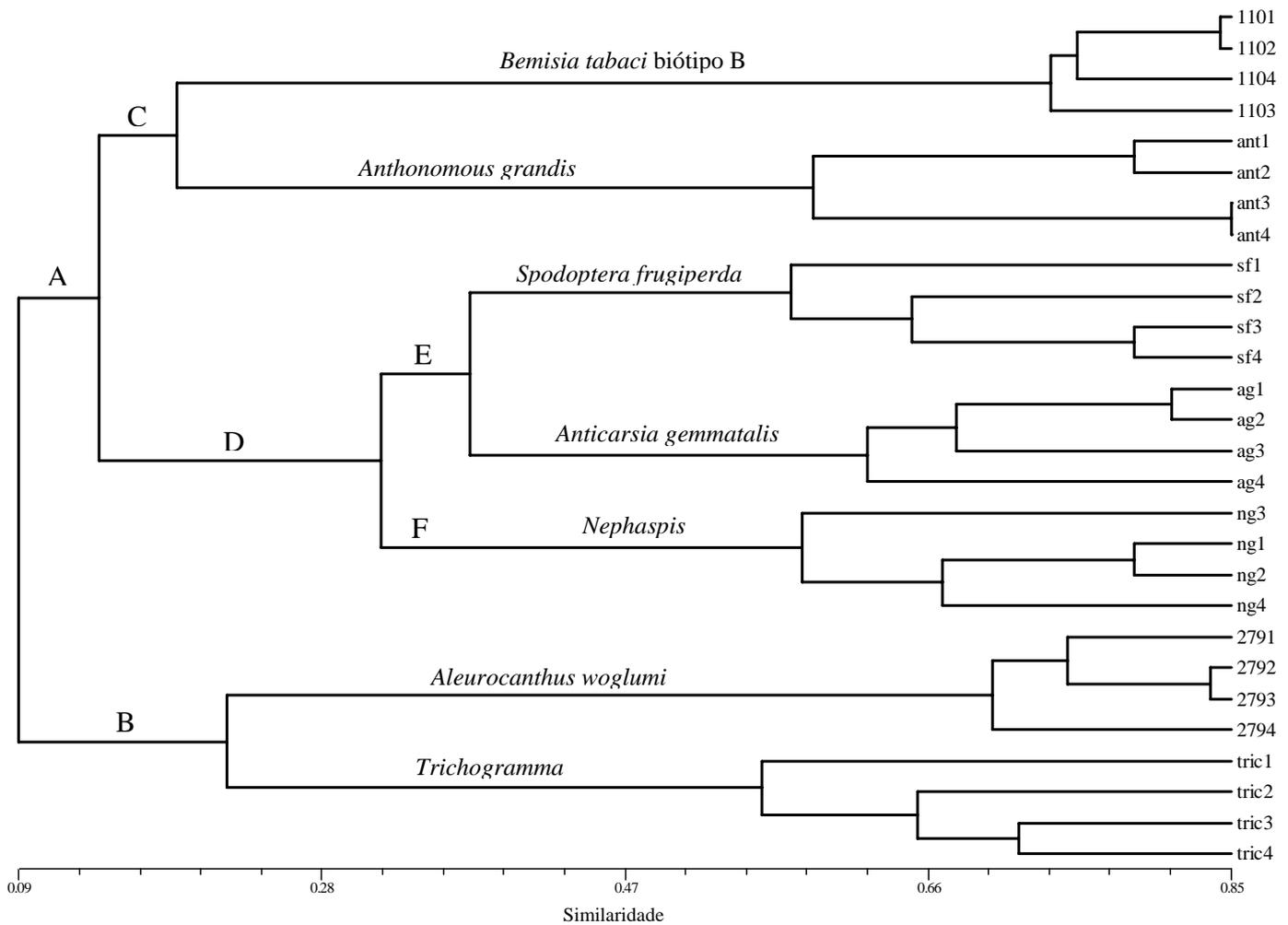


Figura 22 – Determinação do grau de similaridade entre várias populações de insetos pertencentes a diferentes famílias taxonômicas.

A análise com os cinco *primers* de RAPD permitiu organizar as populações de insetos em dois agrupamentos principais. No agrupamento **A** foram encontradas as espécies *B. tabaci* biótipo B, *A. grandis*, *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *N. gemini*. Dentro desse agrupamento, encontrou-se a divisão **C** compreendendo as espécies *B. tabaci* biótipo B e *A. grandis* que apresentaram 20 % de similaridade genética. Dentro da divisão **D** foram encontradas as espécies de lepidópteras *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* e o coccinelídeo *N. gemini*. As lepidópteras formaram um grupo em separado (divisão **E**) apresentando 32 % de similaridade filogenética em relação ao coccinelídeo. Entre as lepidópteras, o grau de similaridade compreendeu 38 %.

Já o agrupamento **B** ficou constituído pelas espécies *A. woglumi* e *Trichogramma* que apresentaram um grau de similaridade de 23 %.

A distribuição das populações de insetos no dendrograma indicou uma baixa similaridade genética entre estas espécies, sendo encontrado um grau de similaridade abaixo de 38 %.

Contudo, o grau de similaridade encontrado dentro de cada população de inseto ficou acima de 54 % sendo que para *B. tabaci* biótipo B, encontrou-se o maior valor de similaridade, ficando em torno de 73 %.

A análise por AMOVA de todas as populações consideradas em conjunto indicou que 77,04 % da variabilidade encontrada era devida a variações entre as populações e que 22,96 % era devida a variações dentro das populações. Fazendo-se a análise das espécies distribuídas nos três agrupamentos principais (**B**, **C** e **D**), observou-se que 53,16 % da variabilidade encontrada era devida a variações entre as populações dentro de cada grupo, 25,26 % era proveniente de variações entre os grupos e que 21,58 % estava relacionada com variações dentro das populações.

Esses resultados indicaram a possibilidade de seleção de determinados fragmentos de DNA, gerados por RAPD e específicos para cada espécie, para o desenvolvimento de *kits* para a identificação das mesmas. Essa estratégia é particularmente importante para estudos envolvendo os biótipos de *B. tabaci*, uma vez que, cada biótipo apresenta características peculiares e a sua introdução em determinadas regiões do mundo se constitui em risco quarentenário. Sendo assim, o desenvolvimento de *kits* diagnósticos, a partir de bandas de DNA geradas por *primers* de RAPD, que sejam estritamente relacionadas a um dado biótipo, é uma ferramenta crucial para a prevenção da entrada de determinados biótipos em áreas agrícolas, minimizando os prejuízos provocados pela entrada de espécies exóticas, diminuindo a demanda pelo uso de produtos químicos nocivos ao homem e ao ambiente, como também, garantindo a manutenção das condições de elevada produtividade.

Provavelmente, o comportamento revelado nos dendrogramas e nas análises de variância molecular apontam para um comportamento complexo da mosca branca em campo. Dessa forma, uma resposta mais adequada para se avaliar o padrão da mosca branca deve agrupar muitas variáveis, desde a estratégia reprodutiva da espécie até outros parâmetros, entre eles, comportamentais, ambientais e biológicos.

Dessa forma, em 1999, Bernays apresenta parâmetros comportamentais para *B. tabaci* durante a escolha da planta hospedeira. Experimentos com fêmeas adultas de *B. tabaci* demonstraram que quando uma mistura de plantas hospedeiras é encontrada em uma

área, a performance do inseto é diminuída quando são comparados os mesmos dados utilizando-se apenas uma planta conhecida como sendo a melhor hospedeira. Em misturas de plantas hospedeiras, as moscas brancas ficam menos tempo sobre a superfície foliar, movendo-se a maior parte do seu tempo e mais freqüentemente para novos locais de alimentação, ficando menos tempo em um determinado ponto de nutrição. O autor sugere que *B. tabaci* acaba por perceber locais alternativos de alimentação e que a performance observada deve estar relacionada com mecanismos de processamento de informação e tomada de decisão pelo inseto. Os dados apontados pelo autor sugerem que esse comportamento observado é o resultado de uma perda de atenção característica quando o inseto está na presença de uma mistura de vários sinais sensoriais complexos. Isso pode resultar em um efeito de distração e conseqüente redução na tomada de decisão por parte do inseto.

De Barro e Hart (2000) estudando as interações de acasalamento entre um biótipo nativo e um exótico de *B. tabaci* ocorrendo na Austrália, observaram uma redução no tamanho da população, um aumento na proporção de machos e pouca produção de ovos por fêmeas acasaladas com machos do outro biótipo. Observou-se, ainda, que não existiam diferenças na produção de ovos por fêmeas não acasaladas ou por fêmeas acasaladas com machos do mesmo biótipo. Além disso, quando é feita uma mistura entre machos e fêmeas de biótipos diferentes, o tempo de atividade de corte é maior do que se comparado entre machos e fêmeas do mesmo biótipo. A partir desses dados, os autores apresentam três hipóteses para o comportamento sexual e reprodutivo de *B. tabaci*: 1) hipótese de distração provocada pelo macho. Nessa hipótese observa-se que casais constituídos por machos e fêmeas de diferentes biótipos gastam mais tempo na atividade de corte e, assim, as fêmeas gastam menos tempo na atividade de oviposição, ou seja, machos e fêmeas não se reconhecem e não terminam o processo de corte com a atividade de acasalamento. Assim, as fêmeas passam menos tempo em atividade de oviposição, como também, os ovos que são depositados não são fecundados e geram apenas machos; 2) modelo de determinação do sexo por complementaridade de *locus* simples. Esse modelo relaciona que a redução na oviposição possa ser devida a produção de zigotos de machos diplóides inviáveis. Esse modelo se apóia no fato de que o sexo é determinado por múltiplos alelos em um único *locus*. Nesse *locus*, fêmeas são heterozigotas (diplóides), machos podem ser hemizigotos (haplóides) e homozigotos (diplóides). Neste último caso, os machos não são viáveis. Dessa forma, em um sistema de isolamento pós-acasalamento, os cruzamentos entre

membros de colônias diferentes provocam um aumento na heterozigotidade e um aumento no número de machos diplóides às expensas de fêmeas heterozigotas, resultando em um aumento nos machos e um declínio no tamanho da colônia. Isso poderia explicar o fato de que mesmo que machos e fêmeas de biótipos diferentes de *B. tabaci* consigam terminar o processo de corte seguindo-se a cópula, ovos de machos diplóides seriam formados durante a embriogênese e, conseqüentemente, reabsorvidos pela fêmea. O resultado seria a redução na taxa de crescimento da colônia com a concomitante produção de um número reduzido de fêmeas, e; 3) incompatibilidade citoplasmática provocada por *Wolbachia*. Esse endossimbionte é conhecido por causar completo ou parcial isolamento reprodutivo pós acasalamento entre espécies ou populações. Se esse for o caso, o resultado será a produção predominante de machos.

Outro parâmetro importante pode ser a presença de predadores na cultura. Nomikou *et al.* (2003) em seu trabalho indicaram que artrópodos herbívoros não selecionam as plantas hospedeiras apenas pela sua qualidade, mas também, pelo risco de predação associado a cada planta hospedeira, ou seja, insetos herbívoros excluem plantas com alto risco de predação do seu perfil de preferência. Essa informação sugere, então, que o inseto herbívoro assume um constante e previsível risco de predação ao invés de um comportamento estático. Dessa forma, plantas hospedeiras são ignoradas a respeito do seu alto risco de predação. A partir dessa informação, os autores relatam que fêmeas adultas de *B. tabaci* aprendem a evitar plantas hospedeiras com ácaros predadores que sejam capazes de atacar as suas formas juvenis. Ao mesmo tempo, *B. tabaci* é capaz de se estabelecer na mesma espécie de planta hospedeira desde que esta não possua predadores para os seus ovos e ninfas. Isso se deve ao fato de que ácaros predadores de mosca branca apresentam dispersão mais lenta, pois são incapazes de voar e, alternativamente, se deslocam de uma planta a outra. Sendo assim, evitando plantas com possíveis predadores, as moscas brancas criam um refúgio temporário para a sua prole. Dessas informações, observa-se que artrópodos herbívoros fazem a associação dos riscos associados às plantas hospedeiras. Esse parece ser um critério importante para a tomada de decisão para a seleção da planta hospedeira.

Sendo assim, ressalta-se a importância de métodos bem estabelecidos para a identificação de biótipos específicos de mosca branca, evitando-se denominações diferentes para o mesmo tipo de biótipo em virtude da dinâmica genética dessa espécie. Perring (2001) em uma revisão a respeito do assunto refere-se à *B. tabaci* como um

complexo de espécies, formado por biótipos e duas espécies crípticas, *B. tabaci* e *B. argentifolii*. Nessa revisão o autor com o auxílio de dados de identificação baseados em características biológicas, bioquímicas e moleculares, agrupa esse complexo de espécies em sete grupos: 1) biótipos A, C, N e R do Novo Mundo; 2) biótipos B (*B. argentifolii*) e B2 que são cosmopolitas; 3) biótipos E e S; 4) biótipo H; 5) biótipos L, Q e J, e um biótipo desconhecido encontrado no Egito; 6) biótipo M e dois biótipos desconhecidos e encontrados em Hainan e na Coreia; 7) biótipo AN. Contudo, nessa mesma publicação, o autor destaca a falta de métodos bem estabelecidos para a análise dos biótipos visando a sua identificação e classificação taxonômica. Já em 2005 De Barro *et al.* por meio de análises moleculares baseadas no estudo das regiões ITS e COI levantaram a hipótese de que não existem critérios biológicos e moleculares suficientes para a separação entre *B. tabaci* e *B. argentifolii* e que o termo *B. argentifolii* deveria não ser utilizado. Esses dados refletem a complexidade da espécie *B. tabaci*, uma vez que, dependendo dos critérios adotados para a análise das populações em questão, dúvidas e inconsistências taxonômicas e filogenéticas aparecem de forma pronunciada, provocando uma série de dificuldades para se chegar a um consenso definitivo sobre essa espécie.

Sendo assim, o desenvolvimento de novos critérios de identificação usando outras marcas moleculares, torna-se imperioso para dirimir dúvidas e para o entendimento da dinâmica dessa espécie. Em função dessa demanda, bandas de DNA monomórficas, consistentes e específicas para os biótipos B e BR, provenientes de populações coletadas em diferentes culturas de várias localidades geográficas e que foram produzidas por perfis de RAPD (Tabela 15) poderão ser usadas para o desenvolvimento de um método mais preciso (SCAR, por exemplo) de identificação de biótipos, para o monitoramento da dispersão e para o entendimento da dinâmica desses biótipos específicos de mosca branca.

Tabela 15 – Fragmentos de DNA obtidos pelo emprego de vários *primers* de RAPD candidatos ao desenvolvimento de marcadores moleculares específicos (SCAR) para a identificação dos biótipos B e BR de *B. tabaci*.

<i>Primer</i>	Biótipo	Fragmento de RAPD (pb)
OPA-05	B	600
		900
OPA-10	B	400
		900
	BR	1000
OPA-11	B	550
		1100
	BR	500
OPA-13	B	600
		1000
		1600
	BR	800
OPA-15	B	800
		700
	BR	700
		1100

A partir desse ponto, esses dados poderão resultar em informações valiosas para a elaboração de estratégias de controle mais eficientes e servir de referência para a elaboração de medidas fitossanitárias mais efetivas contra essa espécie de aleirodídeo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdullahi, I., Winter, S., Atiri, G I. e Thottappilly, G. (2003). Molecular characterization of whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) populations infesting cassava. **Bulletin of Entomological Research**, 93, 97-106.

Abdullahi, I., Atiri, G. I., Thottappilly, G e Winter, S. (2004). Discrimination of cassava-associated *Bemisia tabaci* in Africa from polyphagous populations, by PCR\_RFLP on the internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA. **J. Appl. Entomol.**, 128, 81-87.

Agusti, N., De Vicente, M. C. e Gabarra, R. (1999). Development of sequence amplified characterized region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new polymerase chain reaction-based technique for predator gut analysis. **Molecular Ecology**, 8, 1467-1474.

Basu, A. N. (1995). *Bemisia tabaci* (Gennadius): crop protection and principal whitefly vector of plant viruses. New Delhi: Westview Press. 183p.

Bernays, E. A. (1999). When host choice is a problem for a generalist herbivore: experiments with the whitefly, *Bemisia tabaci*. **Ecological Entomology**, 24, 260-267.

Brown, F. J., Cahill, M., Denholm, I. e Devonshire, A. L. (1995). Characterisation and distribution of esterase electrophoresis in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). **Biochem. Genetics**, 33, 205-214.

Brown, J. K., Lambert, G. M., Ghanim, M., Czosnek, H. e Galbrath, D. W. (2005). Nuclear DNA content of the whitefly *Bemisia tabaci* (Aleyrodidae: Hemiptera) estimated by flow cytometry. **Bulletin of Entomological Research**, 95, 309-312.

- Burban, C., Fishpool, L. D. C., Fauquet, C., Fargette, D. e Thouvenel, J. –C. (1992). Host-associated biotypes within West African populations of the whitefly *Bemisia tabaci* (Genn.). (Hom., Aleyrodidae). **J. Appl. Ent.**, 113, 416-423.
- Byrne, D. N. e Bellows, T. S. (1991). Whitefly biology. **Annu. Rev. Entomol.**, 36, 431-457.
- Cervera, M. T., Cabezas, J. A., Simon, B., Martinez-Zapater, J. M., Beitia, F. e Cenis, J. L. (2000). Genetic relationship among biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemíptera: Aleyrodidae) based on AFLP analysis. **Bulletin of Entomological Research**, 90, 391-396.
- Coats, S. A., Brown, J. K. e Hendrix, D. L. (1994). Biochemical characterization of biotype-specific esterase in the whitefly, *Bemisia tabaci* Genn (Homoptera: Aleyrodidae). **Insect Biochem. Molec. Biol.**, 24 (7), 723-728.
- De Barro, P. J. e Driver, F. (1997). Use of RAPD-PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). **Australian Journal of Entomology**, 36, 149-152.
- De Barro, P. J., Driver, F., Trueman, J. W. H. e Curran, J. (1999). Phylogenetic relationship of world populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) using ribosomal ITS1. **Molecular Phylogenetics and evolution**, 16 (1), 29-36.
- De Barro, P. J. e Hart, P. J. (2000). Mating interactions between two biotypes of the whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemíptera: Aleyrodidae) in Austrália. **Bulletin of Entomological Research**, 90, 103-112.
- De Barro, P. J. (2005). Genetic structure of the whitefly *Bemisia tabaci* in the Asia-Pacific region revealed using microsatellite markers. **Molecular Ecology**, 14, 3695-3718.
- De Barro, P. J., Trueman, J. W. H. e Frohlich, D. R. (2005). *Bemisia argentifolii* is a race of *B. tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae): the molecular genetic differentiation of *B. tabaci* populations around the world. **Bulletin of Entomological Research**, 95, 193-203.

Fauquet, C. e Fargette, D. (1990). African cassava mosaic virus: etiology, epidemiology, and control. **Plant Disease**, 74, 404-411.

Ferreira, M. E. e Grattapaglia, D. (1998). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220 pp.

Frohlich, D. R., Torres-Jerez, I., Bedford, I. D., Markham, P. G. e Brown, J. K. (1999). A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. **Molecular Ecology**, 8, 1683-1691.

Frutos, R., Federici B. A., Revet, B. e Bergoin, M. (1994). Taxonomic studies of Rickettsiella, Rickettsia, and Chlamydia using genomic DNA. **J. Invertebr. Pathol.**, 63, 294-300.

Gawel, N. J. e Bartlett, A.C. (1993). Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. **Insect Molecular Biology**, 2 (1), 33-38.

Guirao P., Beitia, F e Cenis, J. L. (1994). Aplicación de la técnica RAPD-PCR a la toxonomía de moscas blancas (Homoptera, Aleyrodidae). **Bol. San. Veg. Plagas**, 20, 757-764.

Gunning, R. V., Byrne, F. J. e Devonshire, A. L. (1997). Electrophoretic analysis of non-B and B-biotype *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) in Australia. **Australian Journal of Entomology**, 36, 245-249.

Haymer, D. S. (1994). Arbitrary (RAPD) primer sequences used in insect studies. **Insect Molecular Biology**, 3 (3), 191-194.

Kirk, A. A., Lacey, L. A., Brown, J. K., Ciomperlik, M. A., Goolsby, J. A., Vacek, D. C., Wendel, L. E. e Napompeth, B. (2000). Variation in the *Bemisia tabaci* s. l. species complex (Hemiptera: Aleyrodidae) and its natural enemies leading to successful biological control of *Bemisia* biotype B in the USA. **Bulletin of Entomological Research**, 90, 317-327.

Legg, J. P. (1999). Emergence, spread and strategies for controlling the pandemic of cassava mosaic virus disease in east and central Africa. **Crop protection**, 18, 627-637.

Lima, L. H., Campos, L., Moretzsohn, M. C., Návia, D., Ribeiro e Silva, O. L. e Oliveira, M. R. V. (1999). II. Populações de *Bemisia tabaci* (Gennadius) raça B no Brasil: análise da diversidade genética por RAPD. **Pesquisa em Andamento**, 99, 1-6.

Lima, L. H. C., Návia, D., Inglis, P. W. e de Oliveira, M. R. V. (2000). Survey of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes in Brazil using RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, 23 (4), 781-785.

Liu, H. Y., Cohen, S. e Duffus, J. E. (1992). The use of isozyme patterns to distinguish sweetpotato whitefly (*Bemisia tabaci*) biotypes. **Phytoárasitica**, 20 (3), 187-194.

Martinez, S. S., de Carvalho, A. O. R., Vieira, L. G. Nunes, L. M. e Bianchini, A. (2000). Identification, geographical distribution and host plants of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotypes (Homoptera: Aleyrodidae) in the state of Paraná, Brazil. **An. Soc. Entomol. Brasil**, 29 (3), 597-603.

Maruthi, M. N., Colvin, J. e Seal, S. (2001). Mating compatibility, life-history traits, and RAPD-PCR variation in *Bemisia tabaci* associated with the cassava mosaic disease pandemic in East Africa. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 99, 13-23.

Monnerat, R.G., Leal-Bertioli, S., Bertioli, D., Butt, T. e Bordat, D. (2004). Variabilidade genética do parasitóide *Diadegma* sp. através de RAPD-PCR. **Horticultura Brasileira**, 22 (1), 90-92.

Moya, A., Guirao, P., Cifuentes, D., Beitias, F. e Cenis, J. L. (2001). Genetic diversity of Iberian populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. **Molecular Ecology**, 10, 891-897.

Nomikou, M., Janssen, A. e Sabelis, M. W. (2003). Herbivore host plant selection: whitefly learns to avoid host plants that harbour predators of her offspring. **Oecologia**, 136, 484-488.

Oliveira, M. R. V., Lima, L. H. e Ferreira, L. T. (1997). Análise eletroforética de populações da mosca-branca, *Bemisia tabaci* raça B (= *B. argentifolii*) (Homoptera, *Aleyrodidae*). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. **Pesquisa em andamento**, 11, 1–6.

Oliveira, M. R. V., Lima, L. H. C., Návia, D. e Vieira, P. R. G. (1998). Avaliação das populações de *Bemisia tabaci* (Gennadius) através de RAPD-PCR, no Brasil.. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. **Pesquisa em andamento**, 18, 1–6.

Perring, T. M., Cooper, A. e Kazmer, D. J. (1992). Identification of the poinsetia strain of *Bemisia tabaci* (Homoptera: *Aleyrodidae*) on broccoli by electrophoresis. **J. Econ. Entomol.**, 85 (4), 1278-1284.

Perring, T. M., Cooper, A. D., Rodriguez, R. J., Farrar, C. A. e Bellows, T. S. (1993). Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. **Science**, 259, 74-77.

Perring, T. M. (2001). The *Bemisia tabaci* species complex. **Crop Protection**, 20, 725-737.

Queiroz, P. R., Martins, E. S., Monneratt, R. G. e Lima, L. H. C. (2004). Análise da variabilidade de uma população de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (Lepidóptera: Noctuidae) por meio de marcadores moleculares RAPD. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, 75, 18 p.

Rohlf, F. J. (1993). NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate system. Version 1.80. Applies Biostatistics Inc., New York.

Ronda, M., Adán, A., Cifuentes, D., Cenis, J. L. e Beitia, F. (1999). Laboratory evidence of interbreeding between biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: *Aleyrodidae*) present in Spain. Abstracts VII international Plant Virus Epidemiology Symposium, Agudulce (Almería), pp. 83-84.

Ryckewaert, P. e Alauzet, C. (2001). Characterization of *Bemisia* (Hom., Aleyrodidae) from the lesser Antilles by electrophoresis. **J. Appl. Ent.**, 125, 263-266.

Schneider, S., Roessli, D. e Excoffier, L. (2000). Arlequin ver. 2000: A software for populations genetics data analysis. Genetics and biometry laboratory. University of Geneva, Switzerland.

Sneath, P. H. A. e Sokal, R. R. (1973). Numerical Taxonomy. Freeman: San Francisco. 573 pp.

Sosa-Gómez, D. R., Tigano, M. S. e Arantes, O. M. N. (1998). Caracterização de entomopatógenos. In: Controle Microbiano de Insetos, (ed. Alves, S. B.), Piracicaba – SP, FEALQ = Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, pp. 731-763.

Viscarret, M. M., Torres-Jerez, I., Agostini de Manero, E., López, S. N., Botto, E. E. e Brown, J. K. (2003). Mitochondrial DNA evidence for a distinct new world group of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) indigenous to Argentina and Bolívia, and presence of the old world B biotype in Argentina. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, 96 (1), 65-72.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. e Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18 (22), 6531-6535.

Wool, D., Gerling, D., Nolt, B. L., Constantino, L. M., Bellotti, A. C. e Morales, F. J. (1989). The use of electrophoresis for identification of adult whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) in Israel and Colombia. **J. Appl. Entomol.**, 107, 344-350.

Wool., D., Gerling, D. Bellotti, A. C., Morales, F. J. e Nolt, B. (1991). Spatial and temporal genetic variation in populations of the whitefly *Bemisia tabaci* (Genn.) in Israel and Colombia: an interim report. **Insect Sci. Appl.**, 12, 225-230.

Wool, D., Calvert, L., Constantino, L. M., Bellotti, A. C. e Gerling, D. (1994). Differentiation of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hom., Aleyrodidae) populations in Colombia. **J. Appl. Ent.**, 117, 122-134.

## CAPÍTULO 2

### Desenvolvimento de marcadores SCAR para a identificação de biótipos de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae)

*"Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto".*

*Albert Einstein (1879-1955).*

#### RESUMO

Os marcadores moleculares permitem diferenciar dois ou mais indivíduos a partir da análise de regiões do DNA por meio de técnicas moleculares bem estabelecidas. Por exemplo, marcadores RAPD são de fácil manipulação e de menor custo, embora sejam de resultados menos consistentes. Dessa forma, a conversão dos marcadores RAPD em SCAR permite o desenvolvimento de marcadores mais precisos, fornecendo ferramentas moleculares para a diferenciação de biótipos dentro de uma espécie, tais como, a mosca branca *Bemisia tabaci*. Em função de suas características biológicas diferenciadas, cada biótipo de *B. tabaci* representa riscos diversificados de prejuízos a várias culturas comerciais e, dessa forma, o desenvolvimento de *kits* diagnósticos baseados em DNA é uma medida vantajosa para o monitoramento e o controle da entrada desses biótipos em áreas agrícolas, minimizando os prejuízos causados por esse inseto. Utilizando-se os biótipos B e BR de *B. tabaci*, foram identificados e caracterizados marcadores de RAPD para cada biótipo, seguindo-se o desenvolvimento de marcadores SCAR para a identificação desses biótipos. Utilizando-se amostras de DNA extraídas a partir dos biótipos B e BR nas reações de RAPD, foram selecionadas bandas de DNA específicas para cada biótipo para a clonagem e caracterização moleculares. A partir das informações oriundas da análise das seqüências descritas anteriormente, foram desenhados *primers* para a elaboração de reações de SCAR específicas a cada biótipo. Das análises moleculares

realizadas, observou-se que duas reações de SCAR permitiram a detecção do biótipo B e uma foi específica para o biótipo BR. Utilizando-se amostras de DNA extraídas de várias ordens e famílias de insetos, observou-se a especificidade das reações de SCAR em detectar apenas o biótipo investigado. Os testes de consistência revelaram a eficiência e a especificidade dos conjuntos de *primers*, permitindo identificar o biótipo B em variadas condições de monitoramento e contaminação com DNA exógeno. Dessa forma, foi possível o estabelecimento de testes de identificação de biótipos de *B. tabaci* por meio da técnica de SCAR. O desenvolvimento de marcadores específicos para cada biótipo de *B. tabaci* é uma etapa decisiva para o estabelecimento de estratégias baseadas em DNA para a detecção e a prevenção da entrada de novos biótipos no Brasil, minimizando os riscos provocados pela entrada de insetos exóticos no agro-ecossistema brasileiro.

## INTRODUÇÃO

Os marcadores moleculares são regiões do DNA que permitem diferenciar dois ou mais indivíduos, uma vez que, estes são herdados geneticamente (Milach, 2005). Os distintos tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar a variação ao nível do DNA, e assim variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e reprodutibilidade. Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos de acordo com a metodologia utilizada para identificá-los: a) hibridação ou; b) amplificação de DNA. Entre os marcadores identificados por hibridação estão o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – Polimorfismo no Comprimento de Fragmento de Restrição, Botstein *et al.*, 1980) e os minissatélites ou *locus* VNTR (Variable Number of Tandem Repeats – Número Variável de Repetições *in tandem*, Jeffreys *et al.*, 1985). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso, Williams *et al.*, 1990), SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions – Regiões Amplificadas de Sequências Caracterizadas, Paran e Michelmore, 1993) e Microsatélite (Litt & Lutty, 1989).

Dessa forma, as principais etapas requeridas para a obtenção de resultados variam com o tipo de marcador molecular utilizado. Além disso, as tecnologias de marcadores moleculares estão evoluindo rapidamente e modificações já existem para algumas técnicas

de obtenção destes. Contudo, os tipos de marcadores anteriormente descritos são ainda os mais utilizados em estudos genéticos e programas de melhoramento. Ainda, com relação às aplicações, os marcadores também estão sendo utilizados na caracterização molecular de insetos e na elaboração de estratégias de identificação destes quando interceptados durante o intercâmbio de *commodities* entre países produtores de insumos agropecuários.

Atributos como consistência e tempo para obtenção de resultados, nível de polimorfismo obtido, custo e facilidade de uso são importantes para a implementação de marcadores moleculares na rotina de um programa de melhoramento ou em programas de detecção de insetos exóticos. O passo inicial consiste em fazer uma comparação entre os tipos de marcadores a serem utilizados em programas de identificação de espécies. Por exemplo, enquanto os marcadores de RFLP têm sido utilizados em estudos de mapeamento comparativo em função da consistência dos resultados obtidos, estes tendem a ser mais caros e mais difíceis de implementação em determinados programas. Isso se deve ao fato de que esta categoria de marcador se baseia no princípio de que a distância entre os sítios de restrição no DNA difere entre os indivíduos. Estes sítios de restrição fornecem um perfil de bandas que permite a identificação de forma precisa do indivíduo analisado. Se o DNA de dois indivíduos for cortado com uma mesma enzima, obtêm-se dois padrões de fragmentação do DNA que são distintos pela variação no comprimento dos fragmentos de restrição que foram produzidos, uma vez que, cada padrão de fragmentos é único em cada indivíduo. A ocorrência de muitos padrões de fragmentos com diferentes comprimentos irá originar o polimorfismo, elemento essencial que caracteriza essa técnica. Contudo, os entraves à utilização dessa técnica se devem: a) ao método de extração de DNA, pois, as enzimas de restrição são sensíveis à presença de contaminantes (fenol, proteínas, outros elementos diferentes à natureza do DNA) resultando em baixa eficiência da digestão ou detecção de atividade estrela, gerando perfis de baixa qualidade; b) a quantidade de DNA requerida, necessitando de microgramas de DNA genômico para a digestão. Em determinadas amostras essa quantidade de DNA é limitante; c) o emprego de sondas marcadas radioativamente, o que eleva o custo da técnica, além da necessidade de procedimentos adicionais para o acondicionamento e o descarte de material radioativo; d) e a demanda de mão-de-obra e tempo, uma vez que, são requeridos muitos passos sequenciais até a obtenção do radiograma e, havendo falha em algum passo do processo, compromete o desenvolvimento das etapas posteriores.

Por outro lado, marcadores identificados por amplificação, especialmente RAPD, são mais fáceis de se manipular e de custo menor, embora sejam de resultados menos

consistentes. Esta técnica utiliza um único oligonucleotídeo sintético como iniciador do processo de amplificação, que produz um polimorfismo detectado pela presença ou ausência de bandas discretas de DNA. A técnica de RAPD é mais simples e rápida, requerendo menores quantidades de DNA, não envolvendo o emprego de sondas radioativas, não necessita de informações prévias da seqüência de DNA da espécie em estudo e demanda menos mão-de-obra. Esta técnica consiste em extrair o DNA dos indivíduos a serem analisados e submetê-los às reações de amplificação, utilizando um *primer* decamérico de seqüência aleatória a cada reação da amplificação. Um produto de amplificação é gerado para cada região cromossômica flanqueada por um par de sítios de iniciação. Os fragmentos amplificados são separados por eletroforese em gel de agarose. O princípio dessa técnica reside no fato de que diferentes indivíduos produzem diferentes perfis de fragmentos de amplificação. Entretanto, essa técnica apresenta algumas limitações, tais como, os perfis de DNA podem ser influenciados pelos lotes dos reagentes utilizados, dificultando a repetição dos mesmos e a característica dominante desse marcador que não discrimina entre heterozigotos ou homozigotos. Entretanto, bandas produzidas por amplificação de DNA genômico com *primers* aleatórios têm permitido a identificação de segmentos específicos de DNA, característicos de uma única linhagem que podem ser convertidos, posteriormente, para outra categoria de marcador molecular.

Para melhorar a precisão dos marcadores de RAPD e convertê-los em marcadores codominantes, Paran e Michelmore (1993) desenvolveram a técnica conhecida como SCAR. Os marcadores SCAR são baseados no sequenciamento de fragmentos polimórficos gerados por RAPD e do desenho de *primers* superiores a 10-mer específicos a esses dados fragmentos de RAPD. A desvantagem se relaciona com o desenvolvimento dos *primers*, o que eleva o custo. Entretanto, uma vez que estes estejam disponíveis, esta técnica apresenta custo comparável ao RAPD. Os marcadores SCAR são mais vantajosos pois representam *locus* únicos geneticamente definidos, identificados pela amplificação por PCR do DNA genômico, com pares de *primers* com grande especificidade de pareamento com o DNA (Borém e Santos, 2002). Com exceção do tipo de *primer* utilizado, o SCAR é muito semelhante à técnica de RAPD, com a vantagem de ser mais consistente, menos sensível à mudanças nas condições de amplificação e representar marcadores codominantes e assim, de maior reprodução (Kethidi *et al.*, 2003). Em virtude das características apresentadas pelos marcadores SCAR, estes apresentam potencial de uso como ferramentas auxiliares na implantação de rotinas em programas de melhoramento genético assistido por marcadores moleculares e de identificação de insetos de interesse

quarentenário. Contudo, os exemplos de seleção assistida por marcadores moleculares ainda são escassos na literatura, especialmente porque as informações de programas de melhoramento de empresas privadas, que são hoje, possivelmente, os principais executores dessa estratégia, ainda não estão disponíveis. Além disso, o limitado uso de marcadores moleculares em programas de melhoramento pode ser consequência do custo e os procedimentos elaborados da maioria dos marcadores disponíveis. Mesmo assim, alguns exemplos publicados, como é o caso da transferência de genes favoráveis de espécies selvagens para cultivada para aumento de tamanho de fruto em tomate (Tanksley et al., 1996; Tanksley & McCouch, 1997), indicam o grande potencial do emprego dos marcadores moleculares para o melhoramento de plantas (Milach, 2005).

Muitos são os aspectos envolvidos na escolha do tipo de marcador molecular a ser utilizado e, por isso, não existe aquele que possa ser considerado superior para todos os atributos. Por esta razão, as opções disponíveis devem ser analisadas antes de ser decidido o tipo de marcador a ser empregado (Milach, 2005).

Na literatura já existem trabalhos disponíveis empregando marcadores SCAR para o estudo de insetos e outros artrópodos. Abe *et al.* (1998) relatam que *Bombyx mori* sofre a ação do vírus da denonucleose tipo I e tipo II, que causam sérios danos econômicos na produção da seda. Certas linhagens de *B. mori* são altamente suscetíveis ou resistentes aos dois tipos de vírus (denominados de DNV-1 e DNV-2). A resistência ao vírus tipo 2 é controlada pelo gene *nsd-2*, enquanto a resistência ao vírus tipo I é controlada pelos genes *nsd-1* e *Nid-1*. Sendo assim, a utilização de linhagens de *B. mori* homozigotas para os genes *nsd-1* e *nsd-2* é a forma mais adequada para o controle das perdas provocadas pelos dois tipos de vírus da denonucleose na produção da seda. Esse objetivo pode ser alcançado por meio do cruzamento entre linhagens comerciais para a obtenção de novas linhagens que sejam resistentes aos dois tipos de vírus. Dessa forma, o emprego de marcadores ligados aos alelos de sensibilidade e/ou resistência é um passo importante para a utilização em programas de seleção assistida por marcadores moleculares. Utilizando-se 280 *primers* de RAPD foram identificadas duas bandas de DNA presentes nos indivíduos suscetíveis, o que permitiu desenvolver um marcador SCAR para a seleção destes dispensando, então, a necessidade de inoculação do vírus tipo I para a seleção dos organismos resistentes.

Simon *et al.* (1999) empregando marcadores SCAR forneceram uma nova ferramenta molecular para investigar a distribuição ecológica de linhagens assexuadas e sexuadas de *Rhopalosiphum padi* e suas relações genéticas. Nesse trabalho, fez-se a

associação do SCAR com diferenças na forma de acasalamento tanto entre populações de laboratório quanto entre populações de campo desse afídio, demonstrando-se variações na forma de acasalamento dessa espécie. Essa espécie apresenta coexistência entre populações sexuadas e assexuadas, fornecendo um modelo adequado para estudos a respeito da evolução da variação da estratégia de acasalamento no contexto das teorias a respeito da origem e manutenção da reprodução sexuada. Nesse aspecto, marcadores RAPD relacionados às diferenças nas formas de acasalamento foram desenvolvidos e convertidos em marcadores SCAR. Essa estratégia permitiu uma análise detalhada da distribuição alélica e divergência do *locus* SCAR entre populações assexuadas e sexuadas, fornecendo evidência para uma perda antiga da reprodução sexuada nesse afídio.

Kethidi *et al.* (2003), por exemplo, realizaram seus estudos com o besouro *Anoplophora glabripennis*, praga endêmica da China e península Coreana que introduzida na América do Norte, tem provocado sérios danos tanto a espécies que produzem secreções açucaradas comestíveis, tais como, *Acer saccharum*, *A. platanoides*, *A. ruber* e *A. negundo* quanto a espécies que não produzem essas secreções, tais como, *Esculus hippocastanum*, *Robinia pseudoacacia* e *Liriodendron tulipifera*. Uma vez que estas espécies de lenhosas estejam infestadas por aquele patógeno, a medida de controle consiste no corte e queima das mesmas. A identificação das lenhosas infestadas pelo patógeno consiste no reconhecimento dos sítios de oviposição do besouro, vazamento de resina e presença de serragem ao redor do sítio de oviposição. A atividade larval também é detectada pela presença de galerias no interior do tronco. Dessa forma, a detecção e a identificação precoce desse inseto e o rápido tratamento são medidas cruciais para o controle dessa praga. Entretanto, as espécies de *Anoplophora* são similares fenotipicamente e não possuem marcadores moleculares específicos para a identificação das diferentes espécies. Dessa forma, os autores testaram 230 *primers* aleatórios e obtiveram um fragmento de 2740 pb específico para *A. glabripennis*. A partir dessa seqüência foram desenhados dois pares de *primers* do tipo SCAR que foram capazes de identificar e diferenciar o patógeno das demais espécies nativas.

Além do emprego dos *primers* de SCAR em sistemas individualizados de PCR, uma das vantagens dessa metodologia molecular é o seu emprego em sistemas multiplex. Behura *et al.* (1999) aplicaram a estratégia do SCAR para distinguir cinco diferentes biótipos de *Orseolia oryzae*, uma praga responsável por provocar perdas consideráveis nas culturas de arroz nos países asiáticos. A partir de 400 *primers* de RAPD, cinco produtos de PCR foram isolados, clonados, seqüenciados e convertidos em marcadores SCAR com

finalidade de diagnóstico. Esses *primers* foram capazes de identificar especificamente os cinco biótipos a partir de um sistema multiplex de PCR. Além disso, esses *primers* foram capazes de diferenciar a espécie *O. oryzae*, de ocorrência na Ásia, da espécie *O. oryzivora*, de ocorrência africana. A grande vantagem de emprego dessa estratégia no diagnóstico dos biótipos de *O. oryzae* é a sua rapidez, praticidade e por não ser afetada por condições bioquímicas e fisiológicas do inseto em estudo.

Seguindo o uso de *primers* de SCAR empregados em um sistema multiplex de PCR, Manguin *et al.* (2002) estudaram *Anopheles dirus*, que compreende um complexo de sete espécies com algumas sendo potenciais vetores da malária no sudeste da Ásia. Esse complexo caracteriza-se pelo fato de que cada espécie do complexo não pode ser diferenciada por caracteres morfológicos e, dessa forma, uma estratégia molecular é importante para o entendimento da ecologia desses potenciais insetos vetores para a implementação de métodos efetivos de controle. A partir dos marcadores de RAPD foram desenhados e combinados seis primers de SCAR que resultaram no desenvolvimento de um simples PCR multiplex capaz de identificar os importantes vetores da malária entre as quatro espécies mais comuns do complexo, ou seja, a espécie: A, de vários países do sudeste asiático; B, Perlis e Malásia e; C e D, da Tailândia.

A partir das informações disponibilizadas, observa-se que a conversão dos marcadores RAPD em SCAR fornece novas ferramentas moleculares para inúmeras aplicações, tais como, a diferenciação de biótipos dentro de uma espécie, identificação das melhores linhagens para programas de melhoramento genético, determinação do espectro de predadores a uma dada espécie de inseto e a aplicação em sistemas multiplex. Outra possibilidade que se vislumbra a aplicação dos marcadores SCAR consiste na detecção de pragas exóticas interceptadas em postos alfandegários. Uma espécie alvo potencial de aplicação dessa técnica é a mosca branca *Bemisia tabaci*. Essa espécie caracteriza-se pelo amplo espectro de biótipos. Cada biótipo apresenta características biológicas diferenciadas com riscos de prejuízos a várias culturas comerciais. Sendo assim, o desenvolvimento de *kits* diagnósticos para os principais biótipos é uma medida extremamente vantajosa para o monitoramento e o controle da entrada desses biótipos de mosca branca em áreas agrícolas, minimizando os prejuízos causados por esse inseto.

## OBJETIVOS

Utilizando-se os biótipos B e BR de *B. tabaci*, os objetivos foram:

Identificar e caracterizar marcadores de RAPD de ocorrência específica em cada biótipo;

Desenvolver marcadores SCAR para a identificação desses biótipos a partir de marcadores RAPD específicos para cada biótipo;

Verificar as condições de aplicação dos marcadores SCAR para a detecção dos biótipos de mosca branca.

## METODOLOGIA

### INDIVÍDUOS DE *Bemisia tabaci*

Fêmeas adultas provenientes de duas populações de *B. tabaci* (Tabela 16) foram identificadas segundo critérios morfológicos e, a seguir, mantidas em álcool 70 % a  $-20^{\circ}$  C para posterior utilização nas técnicas de desenvolvimento de marcadores moleculares.

Tabela 16 – Biótipos de *B. tabaci* utilizados nos experimentos de desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo SCAR.

Biótipo de <i>B. tabaci</i>	Localidade	Cultura
B	Mossoró – RN	Melão
BR	Cuiabá – MT	Algodão

### OBTENÇÃO DE DNA A PARTIR DE *Bemisia tabaci*

Para a utilização nas estratégias moleculares, o DNA foi obtido macerando-se 5 fêmeas adultas e individualizadas de *B. tabaci* em 60  $\mu$ L de tampão de extração (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,3 % e proteinase K 60  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>). O macerado

foi incubado por 15 min a 65 °C, seguindo-se fervura durante 5 min. O homogenato final foi armazenado a – 20 °C até o momento do uso.

## OBTENÇÃO DE DNA A PARTIR DE LEPIDÓPTEROS E COLEÓPTEROS

Para os estudos moleculares, o DNA de indivíduos de terceiro ínstar de lepidópteros e larvas de coleópteros foram extraídas a partir de um método previamente estabelecido (Queiroz *et al.*, 2004) seguindo-se adaptações dos protocolos de Agusti *et al.* (1999) e Monnerat *et al.* (2004).

Submeteu-se um inseto inteiro à maceração e, a seguir, adicionou-se 500 µL de tampão de extração (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,3 % e Proteinase K 120 µg.mL<sup>-1</sup>), incubando-se por 30 min a 65 °C. O homogenato foi centrifugado por 10 min a 10000xg e, o sobrenadante, transferido para um tubo plástico. Adicionou-se 500 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e as fases foram homogeneizadas em vortex por 5 s. O material foi centrifugado por 10 min a 10000xg a 10 °C. A fase aquosa foi então transferida para um novo tubo plástico, repetindo-se a etapa anteriormente descrita.

O DNA foi precipitado pela adição de 30 µL de NaCl 5 M e 1 mL de etanol absoluto incubando-se por 2 h a – 20 °C. Após centrifugação a 10000xg por 10 min a 10 °C, o DNA precipitado foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70 %, seco à temperatura ambiente, ressuspensão em TE 0,1 X (Tris-HCl 1 mM pH 8, EDTA 0,1 mM) e armazenado a – 20 °C. Para as análises de RAPD, utilizou-se o DNA diluído dez vezes (100 ng) em TE 0,1 X.

## OBTENÇÃO DE DNA DE MOSCA NEGRA *Aleurocanthus woglumi*

Fêmeas individualizadas de *A. woglumi* foram maceradas e o seu DNA extraído em 100 µL de tampão de extração (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,3 % e proteinase K 60 µg.mL<sup>-1</sup>). A seguir, completou-se o volume com 200 µL de tampão de extração. O macerado foi incubado por 15 min a 65 °C, seguindo-se fervura durante 6 min

e centrifugação a 10000xg por 10 s. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo plástico e mantido a – 20 °C até o momento do uso.

## REAÇÃO DE RAPD

As reações de amplificação foram realizadas em 30 µL de uma mistura contendo 24,9 µL de água milliQ autoclavada, 3,0 µL de tampão 10 X (Tris-HCl 60 mM pH 8,8, KCl 500 mM e MgCl<sub>2</sub> 20 mM, Amersham, CA, USA), 1,2 µL de um *primer* de seqüência aleatória (Operon Technologies, Inc.) na concentração de 10 µM (Tabela 17), 0,6 µL de dNTP 10 mM, 0,3 µL de *Taq* DNA polimerase (Amersham, CA, USA) e 4 µL de DNA (20 ng).

Tabela 17 – *Primers* de RAPD utilizados na obtenção dos perfis de bandejamento entre os biótipos de *B. tabaci*.

<i>Primer</i>	Seqüência 5' → 3'
OPA – 05	AGGGGTCTTG
OPA – 10	GTGATCGCAG
OPA – 11	CAATCGCCGT
OPA – 13	CAGCACCCAC
OPA – 15	TTCCGAACCC

## CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO

As amplificações foram efetuadas em termociclador (PTC-100 MJ Research) contendo uma etapa inicial de desnaturação de 3 min a 94 °C, programado para 45 ciclos de desnaturação de 1 min a 93 °C, anelamento por 1 min a 35 °C e extensão por 2 min a 72 °C e uma etapa final de extensão de 5 min a 72 °C.

## EXCISÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA SEPARADOS EM GEL DE AGAROSE

Os produtos de reação de RAPD foram aplicados em gel de agarose 0,8 % submerso em tampão TBE 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 1 mM) durante 2 h a 100 V. Ao término da corrida, os géis foram corados por 30 min em uma solução corante contendo brometo de etídio ( $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), descorados por 30 min em água destilada. A seguir, os fragmentos de interesse foram excisados do gel sob luz ultravioleta e purificados usando-se o *kit* Concert<sup>TM</sup> rapid gel extraction system (Gibco BRL) seguindo-se as recomendações do fabricante.

## LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE RAPD EM PLASMÍDIO

Após a excisão e a purificação das bandas de interesse, realizou-se a ligação destas a um vetor de clonagem por meio do *kit* pGEM<sup>®</sup>-T vector system (Promega) segundo as recomendações do fabricante por 16 h a 4 °C.

## CULTURA BACTERIANA PARA CLONAGEM

A colônia bacteriana *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  foi mantida em meio LB líquido (caseína  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; NaCl  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; extrato de levedura  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 7,0) acrescido de glicerol na concentração de 50 % e mantida a - 20 °C.

## TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Um volume de 150  $\mu\text{L}$  da linhagem DH5 $\alpha$  de *E coli* mantida em glicerol foi inoculado em 5 mL de meio LB e mantido por 16 h a 37 °C e 150 rpm. A seguir, 150  $\mu\text{L}$  da cultura foram inoculados em 5 mL de meio LB e mantidos a 37 °C e 150 rpm por 3 h.

Posteriormente, 1,5 mL de meio foram transferidos para tubo estéril, centrifugados a 12000xg por 20 s a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 500  $\mu\text{L}$  de CaCl<sub>2</sub> 50 mM e mantidas por 10 min a 4 °C. A seguir, as células foram lavadas a

12000xg por 20 s com 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  50 mM e mantidas no gelo por 20 min. Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  foram colocadas em tubos estéreis com 3  $\mu\text{L}$  da ligação incubando-se a 4 °C por 20 min, seguindo-se então o choque térmico a 42 °C por 2 min. As células foram recuperadas em 1 mL de meio LB líquido por 1 h a 37 °C e 150 rpm. Ao final do período de recuperação, as culturas foram centrifugadas a 12000xg por 1 min, ressuspensas em 100  $\mu\text{L}$  de meio LB, sendo as células transformadas selecionadas em LB sólido suplementado com ampicilina 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , IPTG 0,5 mM e X-Gal 80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  a 37 °C.

Colônias positivas para a inserção foram então coletadas com palito estéril e transferidas para meio LB sólido suplementado com ampicilina 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , IPTG 0,5 mM e X-Gal 80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  a 37 °C para confirmação da ligação.

## EXTRAÇÃO DE PLASMÍDIOS

Inoculou-se 150  $\mu\text{L}$  de células transformadas de *E. coli* em 5 mL de LB suplementado com ampicilina 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , mantendo-se a 37 °C por 16 h com agitação de 150 rpm. Após a fase de crescimento, os plasmídios foram extraídos utilizando-se o *kit* Concert™ rapid plasmid miniprep system (Gibco BRL) seguindo-se as recomendações do fabricante.

## CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE RAPD

A determinação dos insertos foi feita por meio da digestão do DNA plasmidial com as enzimas de restrição *SacI* e *SacII*. Cada 30  $\mu\text{L}$  de reação continha 0,5  $\mu\text{L}$  *SacI* (10 U. $\mu\text{L}^{-1}$ ), 0,5  $\mu\text{L}$  *SacII* (10 U. $\mu\text{L}^{-1}$ ), 3,0  $\mu\text{L}$  tampão OPA 10 X (One-Phor-All buffer *PLUS*) (Amersham Biotech), 3,0  $\mu\text{L}$  plasmídio e 23,0  $\mu\text{L}$  água milliQ. Os sistemas de digestão foram incubados a 37 °C por 16 h sendo, posteriormente, aplicados em gel de agarose 0,8 % submerso em tampão TBE 1X durante 2 h a 100 V. A documentação fotográfica foi feita usando-se o sistema EagleEye II still video system™ (Stratagene). Em todos os géis, marcadores de massa molecular (Leader 100 bp - GIBCO) foram usados para a determinação do tamanho dos insertos e confirmação do processo de clonagem.

## SEQÜENCIAMENTO DOS FRAGMENTOS DE RAPD, DESENHO E SÍNTESE DE *PRIMERS* DO TIPO SCAR

Uma vez confirmada a clonagem dos fragmentos de RAPD desejados, 100 ng.µL<sup>-1</sup> dos vetores de clonagem foram seqüenciados usando-se o *kit* ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction *Kit* versão 3.1 (Applied Biosystems ) ou DYEnamic ET Terminator Matrix Standard (Applied Biosystems) em um sequenciador ABI-PRISM 377 (Applied Biosystems) para a determinação da composição de nucleotídios de cada banda de RAPD.

Após a obtenção das seqüências provenientes das bandas de RAPD de interesse que foram clonadas, *primers* específicos de 19 a 21 nt foram desenhados para o desenvolvimento de marcadores SCAR e sintetizados a 25 nmol, liofilizados, dessalinizados e desbloqueados (IDT, Inc., Coralville, IA).

## AMOSTRAS USADAS PARA OS TESTES DE IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES SCAR

A confirmação da especificidade dos *primers* de SCAR foi feita utilizando-se o DNA de insetos de várias ordens e biótipos de *Bemisia tabaci* (Tabela 18).

Tabela 18 – Insetos utilizados na análise da especificidade dos *primers* de SCAR para *B. tabaci*.

Amostra	Localidade / Cultura	Identificação
7	Marrocos / Abóbora	<i>B. tabaci</i> biótipo Q
8	Nigéria / Mandioca	<i>B. tabaci</i> biótipo Q
14	Múrcia – Espanha / Tomate	<i>B. tabaci</i> biótipo Q
45	Delegacia Federal de Agricultura – DF	<i>B. tabaci</i> biótipo BR
75	Universidade Federal de Goiás – GO / Pepino	<i>B. tabaci</i> biótipo BR
61	Universidade da Califórnia – Riversidade – CA	<i>B. tabaci</i> biótipo B
110	Itaberaba – BA / Melancia	<i>B. tabaci</i> biótipo B
140	Embrapa Soja / Soja	<i>B. tabaci</i> biótipo B
207	Mossoró – RN / Caju	<i>Aleyrodicus cocois</i>
226	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF / Algodão	<i>B. tabaci</i> biótipo BR
228	Feira de Santana – BA / Mandioca	<i>Aleurothrixus aepim</i>
236	Deadópolis – MS / Mandioca	<i>B. tuberculata</i>
278	Division of Plant Industry – Flórida / <i>Citrus</i>	<i>Aleurocanthus woglumi</i>
281	Águas Mornas – SC / Abobrinha e Pepino	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>
288	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF / Tomate	<i>B. tabaci</i> biótipo B
ae	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF / Laboratório de Criação de Insetos	<i>Aedes aegypti</i>
ag	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF / Laboratório de Criação de Insetos	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
ant	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF / Laboratório de Criação de Insetos	<i>Anthonomous grandis</i>
sf	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF / Laboratório de Criação de Insetos	<i>Spodoptera frugiperda</i>
px	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF / Laboratório de Criação de Insetos	<i>Plutella xylostela</i>

Com a finalidade de averiguar a qualidade da extração de DNA e o potencial dessas amostras em produzir um perfil de bandas, realizou-se uma reação de RAPD com o *primer* OPA-13 e com insetos selecionados aleatoriamente, seguindo-se o procedimento de amplificação já descrito em seção anterior.

### REAÇÕES DE SCAR UTILIZANDO O *Primer* BT-B1

As reações de amplificação foram realizadas em 25  $\mu\text{L}$  de uma mistura contendo 11,1  $\mu\text{L}$  de água milliQ autoclavada, 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão 10 X (100 mM Tris-HCl pH 9,2, 500 mM KCl e 1 % Tween 20), 1,5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  25 mM, 1,5  $\mu\text{L}$  de cada *primer* (IDT, Inc., Coralville, IA) na concentração de 3  $\mu\text{M}$ , 1,2  $\mu\text{L}$  DMSO, 0,3  $\mu\text{L}$  dNTP 10 mM, 0,4  $\mu\text{L}$  *Taq* DNA polimerase (Amersham) 1  $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  e 5,0  $\mu\text{L}$  de DNA (20 ng).

### REAÇÕES DE SCAR UTILIZANDO O *Primer* BT-B3

As reações de amplificação foram realizadas em 25  $\mu\text{L}$  de uma mistura contendo 12,3  $\mu\text{L}$  de água milliQ autoclavada, 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão 10 X (100 mM Tris-HCl pH 9,2, 500 mM KCl e 1 % Tween 20), 1,5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  25 mM, 1,5  $\mu\text{L}$  de cada *primer* (IDT, Inc., Coralville, IA) na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{L}$  dNTP 10 mM, 0,4  $\mu\text{L}$  *Taq* DNA polimerase (Amersham) 1  $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  e 5,0  $\mu\text{L}$  de DNA (20 ng).

### REAÇÕES DE SCAR UTILIZANDO O *Primer* BT-BR1

As reações de amplificação foram realizadas em 25  $\mu\text{L}$  de uma mistura contendo 11,8  $\mu\text{L}$  de água milliQ autoclavada, 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão 10 X (100 mM Tris-HCl pH 9,2, 500 mM KCl e 1 % Tween 20), 1,5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  25 mM, 0,5  $\mu\text{L}$  DMSO, 1,5  $\mu\text{L}$  de cada *primer* (IDT, Inc., Coralville, IA) na concentração de 1,0  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{L}$  dNTP 10 mM, 0,4  $\mu\text{L}$  *Taq* DNA polimerase (Amersham) 1  $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  e 5,0  $\mu\text{L}$  de DNA (20 ng).

### CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO PARA OS PRIMERS BT-B1 E BT-B3

As amplificações foram efetuadas em termociclador (PTC-100 MJ Research) contendo uma etapa inicial de desnaturação de 3 min a 94 °C, programado para 30 ciclos de desnaturação de 1 min a 94 °C, anelamento por 1 min a 63 °C e extensão por 1 min a 72 °C e uma etapa final de extensão de 5 min a 72 °C.

## CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO PARA O PRIMER BT-BR1

As amplificações foram efetuadas em termociclador (PTC-100 MJ Research) contendo uma etapa inicial de desnaturação de 3 min a 94 °C, programado para 30 ciclos de desnaturação de 1 min a 94 °C, anelamento por 1 min a 63,5 °C e extensão por 1 min a 72 °C e uma etapa final de extensão de 5 min a 72 °C.

## TESTE DOS MARCADORES SCAR APLICADOS ÀS PARTES DO INSETO

Indivíduos do biótipo B de *B. tabaci* coletados em uma colônia estabelecida em casa de vegetação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foram seccionados em duas partes (cabeça e tórax/abdômen) e então o DNA extraído em 30 µL ou 60 µL de tampão de extração conforme procedimento descrito anteriormente (Tabela 4).

## TESTE DOS MARCADORES SCAR APLICADOS AO GÊNERO DE *B. tabaci*

Amostras do biótipo B de *B. tabaci* pertencentes à coleção biológica de referência de insetos da Estação Quarentenária de Germoplasma Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, foram separados conforme o gênero e o DNA extraído conforme a metodologia previamente estabelecida (Tabela 19).

Para os testes de detecção dos marcadores SCAR foram utilizados os *primers* BT-B1 e BT-B3 segundo a metodologia descrita em seções anteriores.

Tabela 19 – Indivíduos de *B. tabaci* utilizados na detecção dos marcadores SCAR em partes do inseto ou em função do gênero.

Amostra	Cultura	Localidade
TC	Tomate	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF
TJ	Tomate	Jataí – MG
B	Berinjela	Jataí – MG
FJ	Feijão	Jataí – MG

#### ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO COM DNA EXÓGENO NAS AMOSTRAS DE *B. tabaci* BIÓTIPOS B E BR

Para a determinação das quantidades mínimas de contaminação das amostras de mosca branca com DNA exógeno, diferentes proporções de DNA de *B. tabaci*, extraído dos biótipos B e BR, foram misturadas com o DNA de *A. gemmatalis* nas seguintes proporções: 1:0, 4:1, 3:2, 1:1, 2:3, 1:4 e 0:1. Em seguida, as misturas foram submetidas às reações de SCAR com os *primers* BT-B1, BT-B3 e BT-BR1.

#### TESTE DE EFICIÊNCIA DOS MARCADORES SCAR SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE MONITORAMENTO

Indivíduos do biótipo B de *B. tabaci* pertencentes a uma colônia estabelecida em casa de vegetação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foram coletados e submetidos a um tratamento com fixação em etanol 100 % por 72 h a -20 °C com posterior manutenção em placas de Petri em estufa a 25 °C.

Outro tratamento consistiu no resfriamento de novas amostras dos insetos por 3 h a -20 °C sob as seguintes condições de monitoramento: a) placa de Petri em estufa a 25 °C; 2) placa de Petri em estufa a 45 °C e; 3) placa de Petri contendo solo a 45 °C.

As amostras foram então monitoradas durante 40 dias e, em intervalos de 24 h, dois indivíduos de cada tratamento foram coletados e o DNA extraído conforme metodologia anteriormente descrita e armazenados a -20 °C até o momento do uso. Posteriormente, as

amostras foram analisadas com conjunto de *primers* de SCAR BT-B1 nas condições de amplificação já descritas em seções anteriores.

#### APLICAÇÃO DOS MARCADORES SCAR EM ROTINA DE IDENTIFICAÇÃO DOS BIÓTIPOS DE *B. tabaci*

Na análise de rotina de laboratório utilizando-se os marcadores SCAR para a identificação do biótipo B de *B. tabaci*, cinco indivíduos de nove populações provenientes de várias localidades do estado do Maranhão (Tabela 20) armazenadas em etanol 70 % a -20 °C e mantidas na coleção biológica de referência de insetos da Estação Quarentenária de Germoplasma Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, foram submetidas à extração de DNA e amplificação com os conjuntos de *primers* de SCAR. Em paralelo, procedeu-se a amplificação por RAPD com o *primer* OPA-13 nas condições já estabelecidas para essa técnica.

Tabela 20 – Amostras utilizadas em rotina de detecção do biótipo B de *B. tabaci* utilizando-se os *primers* de SCAR.

Amostra	Localidade	Cultura
F1	PAD – DF	Couve orgânica
80/05	São Luís - MA	Couve manteiga
81/05	São Luís – MA	Pepino caipira
82/05	São Luís – MA	Tomate
83/05	São Luís – MA	Pepino
84/05	São Luís – MA	Tomate
85/05	São Luís – MA	Quiabo
86/05	São Luís – MA	Goiaba
87/05	São Luís – MA	Açaí
88/05	São Luís - MA	Quiabo

## ANÁLISE POR ELETROFORESE DOS FRAGMENTOS DE DNA GERADOS POR RAPD

Os produtos de amplificação originários das reações de RAPD ou SCAR foram separados em gel de agarose 1,5 % submerso em tampão TBE 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 1 mM) durante 3 h a 160 V. Ao término da corrida, os géis foram corados por 30 min em uma solução corante contendo brometo de etídio ( $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), descorados por 30 min em água destilada e fotografado sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 300 nm. A documentação fotográfica foi feita usando-se o sistema EagleEye II still video system™ (Stratagene).

Em todos os géis, marcadores de massa molecular (Ladder 100 bp - INVITROGEN) foram usados para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados e escolha das prováveis bandas de RAPD a serem selecionadas para o desenvolvimento do marcador SCAR, como também, para a determinação do tamanho dos fragmentos resultantes da amplificação quando se utilizaram os *primers* de SCAR.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando-se o DNA extraído do biótipo B de *B. tabaci* nas reações de RAPD, foram obtidas bandas específicas de aproximadamente 850 pb para esse biótipo com o *primer* OPA-10 e de 582 pb com o *primer* OPA-13. Para o biótipo BR de *B. tabaci* obteve-se uma banda específica de 700 pb com o *primer* OPA-15 (Figura 23).

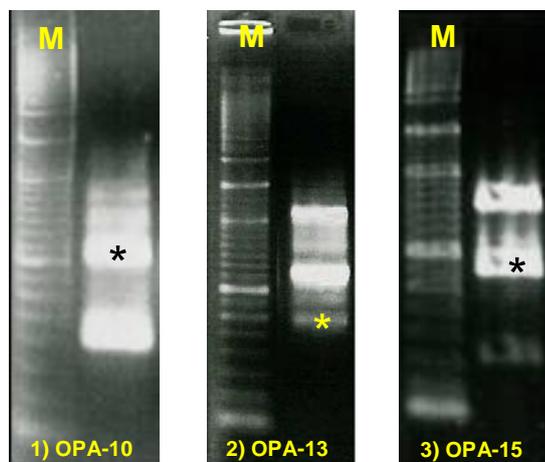


Figura 23 – Fragmentos de RAPD produzidos a partir do DNA extraído dos biótipos de *B. tabaci*. O asterisco indica os fragmentos selecionados para o desenho dos primers de SCAR. Gel 1 = biótipo B amplificado com o primer OPA-10; Gel 2 = biótipo B amplificado com o primer OPA-13; Gel 3 = biótipo BR amplificado com o primer OPA-15. Os números 1 e 2 indicam os biótipos B e BR de *B. tabaci*, nessa ordem. A letra M indica o marcador 100 pb ladder.

Uma vez determinados os perfis eletroforéticos específicos para os biótipos, essas bandas foram excisadas dos géis de agarose e, em seguida, os fragmentos foram ligados ao plasmídeo pGEM-T para a clonagem molecular. As reações de ligação do inserto ao vetor foram então usadas na transformação da linhagem DH5 $\alpha$ . Colônias transformantes de aspecto branco e crescidas em meio suplementado com IPTG/X-Gal/ampicilina foram transferidas para placas suplementadas com estes mesmos componentes para a confirmação da ligação do inserto de interesse.

A seguir, as colônias positivas e crescidas em meio líquido tiveram os plasmídios extraídos e digeridos com as enzimas *SacI* e *SacII*. Após a digestão, foram visualizados em gel de agarose fragmentos de 831 pb, 582 pb e 794 pb, confirmando a clonagem dos insertos de interesse (Figura 24).

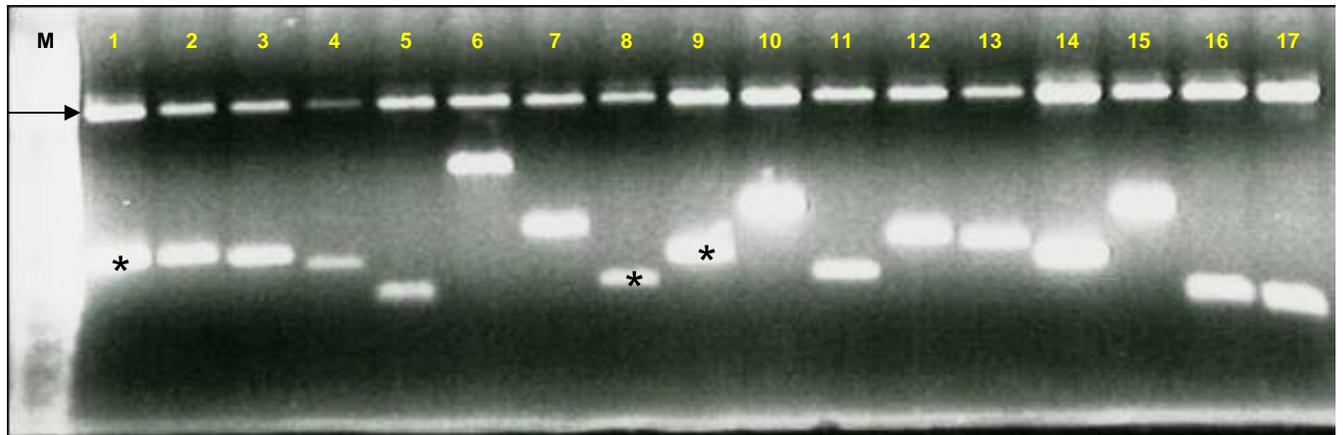


Figura 24 – Digestões de plasmídios resultantes da clonagem de vários fragmentos de RAPD a partir dos biótipos B e BR de *B. tabaci*. Os asteriscos indicam os insertos clonados no vetor pGEM-T, assim como, a seta indica o vetor de clonagem. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder.

Uma vez confirmada a inserção das bandas de RAPD nos seus respectivos vetores de clonagem, os plasmídios contendo os fragmentos de interesse foram sequenciados e a sua composição de nucleotídios então determinada. Para o biótipo B de *B. tabaci* foram obtidos dois padrões de seqüências de DNA de 831 pb (Figura 25) e de 582 pb (Figura 27).

**GTGATCGCAGAATGTCTCACTGCACGCCTGGATATTTACCCCAAGCGCACAA  
GCACGATAAATTGCGGTTGCAGTTTTTGAAGGCGCTTTTGATACTTACAATTTA  
CCTGAGGCCCGGTGCCGAGATGGCCAGATTGAACGAAGTAGGAAACATAGGTG  
GGAAGTGTTCGTATTCAATCAAGTGCCTAGACCTTTTTTTATGACCCCTCCCAA  
TCTATTCTTTCATTAGAGGAAATTGTATCTATTTCAATTTTGATGATTACAATAA  
ACTTGACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACAATGATCCCTCCTACCGCAAACGTGT  
AGCGGGCTGATAAACCTACATTTTCATTTTCGTCCTCTCTGATATCTCTGTATCCT  
GATCGCCTTTTTGGAGGCCCTTATTTGCATGTGATTCTCAAAGTCTCTGTTTC  
TTACATAGTGTTTAATCCCTTGCAATCATCACAGGGCATTTCATTTCAAGAGA  
CCCTAATCAGCATCTTGCCTCATTTTTTCATTTTGATTACCTGACGATATAGCATT  
AAAATTACGCAATATCCTACATAACCATCTGTAAAAATAAAAAAAAAATAAAATA  
AAAAAACATACGGCCACATGAGCATAATCGAAGAAGGGAAACATGCTCGTT  
GATGACGGCGCAGAGATACAACTATTCGTGTTTGATGGATGTCCGTGTTGCATT  
TGCAAATTGAAGGCGCGATGGTGCAGGCGTGATCTCGCAATGCTTCGTTCT  
AAGCAGTCTATTCTGTCAACAAGGTGCCGCTCAGATTTTGGAGAAAAGTTAAA  
AAACGAGTCCCGCATACTTCTCTCCTATTTTCGGCTGCGATCAC**

Figura 25 – Composição de nucleotídios do fragmento de 831 pb obtido do biótipo B de *B. tabaci* com o primer OPA-10. Em negrito encontra-se o primer de RAPD usado nas reações de amplificação.

A análise da composição da seqüência de 831 pb permitiu identificar 60,1 % das bases como sendo Adenina (A) e Timina (T) e 39,9 % correspondente a Citosina (C) e Guanina (G). A leitura das trincas de bases dessa seqüência revelou a presença de 17 códons de parada, não sendo encontrado qualquer peptídeo depositado no GenBank. Foi possível também determinar o perfil de sítios de restrição que estão distribuídos ao longo dessa seqüência (Figura 26).

```

1 NdeII |gatc3
  1 MboI |gatc3
  1 V I A E C L T A R L D I S P K R T S T I
  1 GTGATCGCAGAATGTCTCACTGCACGCCTGGATATTTACCCAAGCGCACAAAGCACGATA
61 MspI c|cgg115
61 HpaII c|cgg115
21 N C G C S F * R R F * Y L Q F T * G R C
61 AATTGCGGTTGCAGTTTTTTGAAGGCGCTTTTGATACTTACAATTTACCTGAGGCCGGTGC
41 R D G Q I E R S R K H R W E V S Y S I K
121 CGAGATGGCCAGATTGAACGAAGTAGGAAACATAGGTGGGAAGTGTTCGTATTCAATCAAG
61 C L D L F L * P L P N L F F H * R K L Y
181 TGCCTAGACCTTTTTTTATGACCCCTCCCAAATCTATTCTTTTCATTAGAGGAAATGTAT
241 NdeII |gatc297
241 MboI |gatc297
  81 L F Q F * * L Q * T * Q K K K K K T M I
241 CTATTTCAATTTTGATGATTACAATAAACTTGACAAAAAAAAAAAAAAAAACAATGATC
101 P P T A N C * R A D K P T F H F V L S D
301 CCTCCTACCGCAAACCTGTTAGCGGGCTGATAAACCTACATTTTCATTTTCGTCTCTCTGAT
361 NdeII |gatc374
361 MboI |gatc374
361 EcoRV gat|atc361 HinfI g|antc407
121 I S V S * S P F W R P L F A C D S S K V
361 ATCTCTGTATCCTGATCGCCTTTTTGGAGGCCCTTATTTGCATGTGATTCCTCAAAAGTC
141 S V S Y I V F * S L A I I T G H F I S R
421 TCTGTTTCTTACATAGTGTTTTAATCCCTTGCAATCATCACAGGGCATTTCATTTCAAGA
161 D P N Q H L A S F F I L I T * R Y S I K
481 GACCCTAATCAGCATCTTGCCTCATTTCATTTTGATTACCTGACGATATAGCATTAAA
181 I T Q Y P T Y H L L K I K K I K * K K H
541 ATTACGCAATATCCTACATAACCATCTGTAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAAACAT
601 TaqI t|cga620 MboII gaagannnnnnn|634
201 T A T * A * S K K G N M L V D D G A E I
601 ACGGCCACATGAGCATAATCGAAGAAGGGAAACATGCTCGTTGATGACGGCGCAGAGATA
221 Q L F V F D G C P C C I C K I E G A M V
661 CAACTATTCGTGTTTGATGGATGTCCGTGTTGCATTTGCAAATTGAAGGCGCGATGGTG
721 NdeII |gatc729
721 MboI |gatc729 HincII gty|rac767
241 R G V I S Q C F V L S S L F C Q Q G A A
721 CGAGGCGTGATCTCGCAATGCTTCGTTCTAAGCAGTCTATTCTGTCAACAAGGTGCCGCT
781 HinfI g|antc808
261 Q I L E K S * K T S P A Y F S P I
781 CAGATTTTGGAGAAAAGTTAAAAACGAGTCCCGCATACTTCTCTCCTATT

```

Figura 26 – Perfil de sítios de restrição distribuídos ao longo da seqüência de 831 pb originada a partir da amplificação do DNA de *B. tabaci* biótipo B com o uso do *primer* OPA-10 de RAPD. Em destaque está indicado o sítio de restrição da enzima *EcoRV*.

Dentro desse fragmento de RAPD foi encontrado um único sítio de restrição para a enzima *EcoRV* na posição 361. Esse sítio poderá ser explorado para o desenvolvimento de perfis de PCR-RFLP quando da suspeita de variabilidade entre indivíduos do biótipo B de *B. tabaci*.

Para a seqüência de 582 pb foram determinadas as composições dos pareamentos A/T e C/G como sendo de 62,4 % e 37,6 %, respectivamente (Figura 5). A análise dos códons indicou a presença de 10 códons de parada não havendo qualquer indicação de peptídio semelhante no GenBank.

**CAGCACCCACGGACATTGAAATTGATCTTGACTAGATGTCAAATCGACGGTTA  
GGCCTACTTTATTTTTACGATATTCTTCCCTTTTTTTCGTTTGCGACGTTTCAA  
ATACTAATCATAAGCCTCTTTTAAATTTTATTGGATGTAACATTTTTTAAAAATA  
AACCCACCGGCTTCGAACGCTGTTTAGACACAAAAATTCAAACTTCCAACAA  
GCAACACAAACGAGACCTAAAAGATATTGAACTGTGATAATAATTTCTAAG  
AACTCTGTAGCGAAGAGTAGGCACTGATTCTTTCGTGAACTTTTTTCTTAAAG  
AGCGATGCCATTTATTAAGGTCAGAATCGTCAATCCTTCGTCGATTGTACCAA  
ACGATTTAAACCCGCCAAACACATGGGGTTTAGTCTATGATGGTAGAGTTCAC  
GAGATAATGGCAATTAAACTCATTGTTTTTAAGGTCATGAAAGAACTACCAG  
TCCAGAAGGGTCATGAAAGCGAAATAAGGGAAGAAAAGCTGTCAAAGAAGAC  
GCTTGATTTCGTTTCCTCCCGAGAGACGAAGGATACAGTGGGGTGCTG**

Figura 27 – Composição de nucleotídios do fragmento de 582 pb obtido do biótipo B de *B. tabaci* com o *primer* OPA-13. Em negrito encontra-se o *primer* de RAPD usado nas reações de amplificação.

A conversão das bases em sítios de restrição indicou um sítio único para a enzima de restrição *SspI* na posição 261 dessa seqüência (Figura 28).

```

1           NdeII |gatc24           StuI agg|cct56
1           MboI |gatc24           TaqI t|cga45
1 Q H P R T L K L I L T R C Q I D G * A Y
1 CAGCACCCACGGACATTGAAATTGATCTTGACTAGATGTCAAATCGACGGTTAGGCCTAC
61           MboII n|nnnnnmtcttc70
21 F I F T I F F P F F R L R R F K I L I I
61 TTTATTTTTTACGATATTCTTCCCTTTTTTTTCGTTTTCGCGACGTTTCAAAAATACTAATCATA
121           MspI c|cgg171
121           HpaII c|cgg171
121           DraI ttt|aaa157       TaqI t|cga177
41 S L F L I L L D V T F F K N K P T G F E
121 AGCCTCTTTTTAATTTTATTGGATGTAACATTTTTTAAAAATAAACCCACCGGCTTCGAA
61 R C L D T K I Q N F Q Q A T Q T R P K R
181 CGCTGTTTACGACACAAAATTCAAAACCTCCAACAAGCAACACAAAACGAGACCTAAAAGA
241           HinFI g|antc296
241           SspI aat|att261       MboII gaagannnnnnn|294
81 Y * T V I I I F L R T L * R R V G T D S
241 TATTGAACTGTGATAATAATATTTCTAAGAACTCTGTAGCGAAGAGTAGGCACTGATTCT
301           HinFI g|antc348
101 F V N F F S * R A M P F I K V R I V N P
301 TTCGTGAACTTTTTTTCTTAAAGAGCGATGCCATTTATTAAGGTCAGAATCGTCAATCCT
361           RsaI gt|ac372
361           TaqI t|cga365       DraI ttt|aaa385
121 S S I V P K R F K P A K H M G F S L * W
361 TCGTCGATTGTACCAAACGATTTAAACCCGCCAAACACATGGGGTTTAGTCTATGATGG
141 * S S R D N G N * N S L F L R S * K N Y
421 TAGAGTTCACGAGATAATGGCAATTAAACTCATTGTTTTTTAAGGTCATGAAAGAACTAC
481           MboII gaagannnnnnn|526
481           AluI ag|ct522
161 Q S R R V M K A K * G K K S C Q R R R L
481 CAGTCCAGAAGGGTCATGAAAGCGAAATAAGGGAAGAAAAGCTGTCAAAGAAGACGCTTG
541           AvaI c|ycgrg553
541           MboII gaagannnnnnn|543
541 HinFI g|antc541
181 I R F L P R D E G Y S G C *
541 ATTCGTTTCTCCCGAGAGACGAAGGATACAGTGGGTGCTGA

```

Figura 28 – Perfil de sítios de restrição distribuídos ao longo da seqüência de 582 pb originada a partir da amplificação do DNA de *B. tabaci* biótipo B com o uso do *primer* OPA-13 de RAPD. Em destaque está indicado o sítio de restrição da enzima *SspI*.

Esse sítio único de restrição poderá ser explorado pela metodologia de PCR-RFLP para a identificação de possíveis variações genéticas que ocorram dentro e entre as populações do biótipo B de *B. tabaci*.

A mesma estratégia de clonagem e sequenciamento desenvolvida para o biótipo B foi aplicada ao biótipo BR de *B. tabaci* a partir do fragmento de 831 pb gerado por RAPD (Figura 29).

**TTCCGAACCCGCAAGATAGTGATTTTCCACGCCGAGATTCGTAGTAATAGTNT  
CCACATGTGATCCTCCCCGTGCAGTGCTGTGATTTTTTTTAGTACCCTTGTTTTT  
CGGAGTCGTATGACTTCCTTGTTGCTAGTTGTTTAAGAAAATAGTCAAGCTGTG  
GGGCTCAGGGGCTTTCTTCCTTCCCCCGCAAGGGATGTACTACCCGGTAAGAT  
GTTTTGACTCCATCCATTTTGTTTTTCTCTCGTGAATCGAATCTCACGCAAG  
GCGTGTTCCGCGAATTCTGAAGCGCGTCTCGGCCAGAGAGAGGCCCTCGTTCC  
GTTGCGCAATTTTATGCTGAAACTCCTCGATTTTCGTACAGATTCGCTTCCGAGT  
TTCGCAACATGCAGGACAAACTTGTGGATTCTGTCTGGCCACACAGTCCTATC  
ATATTGCTCAATATTGGGCGCCCTCTGTTTACTAATGTAATAACGGAGGGTCCC  
TCCAGCTTTTGTTTCTCAACTGAAATCCGAGCTAAATCTTGGCTTTTGTTTCAGTC  
GTTATTAATCTAGATCTTGGGCACACTGGTCTTAATGTTTCTTTCTTATCAGTTG  
TTATCCATATTCATGGACATTTCTTTTCGAGCGTAGGGTTACACTGTATGTTTAC  
GTTCAACTACCGAAGTAGATTATGTAGTAGGCTCCTTTGTCAGCACAGCAGAA  
TGCATTACAGAACCAAATATTCCACCTATTCGTTACTTTAAATGTACGGCTT  
AAATCTCAAGTTTAATCCTCCACCAAAGGGTTTCGGAA**

Figura 29 – Composição de nucleotídios do fragmento de 793 pb obtido do biótipo BR de *B. tabaci* com o *primer* OPA-15. Em negrito encontra-se o *primer* de RAPD usado nas reações de amplificação.

Para esse fragmento foi determinada uma composição de 56,2 % para o pareamento A/T e de 43,7 para o par de bases C/G. Foram identificados 11 códons de parada e, mais uma vez, não identificada qualquer seqüência semelhante no GenBank.

A seqüência de bases desse fragmento foi então usada para a determinação do perfil de restrição, onde foram identificados três sítios únicos para as enzimas de restrição *EcoRI* (posição 282), *SspI* (posição 443) e *XbaI* (posição 549). Esses sítios são alvos potenciais para serem usados em estudos de determinação de variabilidade dentro do biótipo BR de *B. tabaci* (Figura 30).

```

1                                     HinfI g|antc37
1 F R T R K I V I F H A E I R S N S X H M
1 TTCCGAACCCGCAAGATAGTGATTTTCCACGCCGAGATTTCGTAGTAATAGTNTCCACATG
61 NdeII |gatc62
61 MboI |gatc62                               RsaI gt|ac97   HinfI g|antc112
21 * S S P C S A V I F F S T L V F R S R M
61 TGATCCTCCCCGTGCAGTGCTGTGATTTTTTTTTAGTACCCTTGTTTTTTCGGAGTCGTATG
121                                     MboII n|nnnnnnntcttc170
121                                     AluI ag|ct158
41 T S L L L V V * E N S Q A V G L R G F L
121 ACTTCCTTGTGTAGTTGTTTAAAGAAAATAGTCAAGCTGTGGGGCTCAGGGGCTTTCTT
181                                     MspI c|cgg207
181                                     HpaII c|cgg207
181                                     RsaI gt|ac201
61 P S P A R D V L P G K M F * H S I H F V
181 CCTTCCCCCGCAAGGGATGTACTACCCGTAAGATGTTTTGACACTCCATCCATTTTGT
241                                     HinfI g|antc257
241                                     TaqI t|cga255
241                                     HinfI g|antc252
81 F L S * I E S H A R R V P R I L K R V S
241 TTTCTCTCGTGAATCGAATCTCACGCAAGGCGTGTTCGCGAATTCTGAAGCGCGTCTCG
301                                     RsaI gt|ac359
301                                     TaqI t|cga350
101 A R E R P S F R C A I L C * N S S I S Y
301 GCCAGAGAGAGGCCCTCGTTCCGTTGCGCAATTTTATGCTGAAACTCCTCGATTTTCGTAC
361 HinfI g|antc363                               HinfI g|antc405
121 R F A S E F R N M Q D K L V G F C L A T
361 AGATTTCGCTTCCGAGTTTCGCAACATGCAGGACAACTTGTGGATTCTGTCTGGCCACA
421                                     NarI qg|cggc449
421                                     SspI aat|att443
141 Q S Y H I A Q Y W A P S V Y * C N N G G
421 CAGTCCTATCATATTGCTCAATATTGGGCGCCTCTGTTTACTAATGTAATAACGGAGGG
481                                     AluI ag|ct490                               AluI ag|ct516
161 S L Q L L F L N * N P S * I L A F V Q S
481 TCCCTCCAGCTTTTGTCTCAACTGAAATCCGAGCTAAATCTTGGCTTTTGTTCAGTCC
541                                     NdeII |gatc552
541                                     MboI |gatc552
541                                     BglII a|gatct552
541                                     XbaI t|ctaga549
541 VspI at|taat545
181 L L I * I L G T L V L M F L S Y Q L L S
541 TTATTAATCTAGATCTTGGGCACACTGGTCTTAATGTTTCTTTCTTATCAGTTGTTATCC
601                                     TaqI t|cga622
201 I F M D I S F R A * G Y T V C L R S T T
601 ATATTCATGGACATTTCTTTTCGAGCGTAGGGTTACACTGTATGTTTACGTTCAACTACC
221 E V D Y V V G S F V S T A E C I T E P K
661 GAAGTAGATTATGTAGTAGGCTCCTTTGTCAGCACAGCAGAATGCATTACAGAACCAAAA
721                                     RsaI gt|ac750
721                                     DraI ttt|aaa744
241 L F H L F V T L N V R L K S Q V * S S T
721 TTATTCCACCTATTCGTTACTTTAAATGTACGGCTTAAATCTCAAGTTTAATCCTCCACC
261 K G F G
781 AAAGGGTTCGGAAA

```

Figura 30 – Perfil de sítios de restrição distribuídos ao longo da seqüência de 794 pb originada a partir da amplificação do DNA de *B. tabaci* biótipo BR com o uso do *primer* OPA-15 de RAPD. Em destaque estão indicados os sítios de restrição para as enzimas *EcoRI*, *SspI* e *XbaI*.

Esses sítios de restrição que foram identificados na seqüência do fragmento de RAPD obtido a partir do biótipo BR poderão ser utilizados na metodologia de PCR-RFLP para a identificação de possíveis variações genéticas do biótipo BR de *B. tabaci*.

A técnica de PCR-RFLP consiste na amplificação de regiões específicas do DNA da amostra, por exemplo, DNAMt (mitocondrial) ou DNAr (ribossomal) seguindo-se a digestão com enzimas de restrição que cortem em pontos específicos do produto de PCR. O resultado é um perfil de digestão do produto de PCR que pode ser utilizado para a diferenciação entre espécies de insetos. Essa estratégia tem sido adotada, por exemplo, por Malgorn e Coquoz (1999) para a identificação de califorídeos de interesse forense. Utilizando-se primers para a subunidade I da citocromo oxidase, os autores obtiveram um produto de PCR que foi digerido com a enzima de restrição *DdeI*. Os perfis de digestão em gel de agarose permitiram diferenciar as espécies de califorídeos: *Lucilia illustris*, *Lucilia ampullacea*, *Calliphora vicina*, *Lucilia sericata* e *Lucilia caesar*, independente do estágio de desenvolvimento desses insetos. Essa mesma estratégia poderá ser aplicada futuramente em estudos com *B. tabaci* empregando-se os primers de SCAR e as enzimas de restrição previamente selecionadas em questões de identificação de biótipos ou determinação de variabilidade entre as populações desse inseto.

Em função dos resultados obtidos, observou-se que os fragmentos de RAPD correspondem, provavelmente, a seqüências intergênicas, em virtude do número de códons de parada que foram encontrados dentro das seqüências, como também, devido a ausência de correspondência tanto para os nucleotídeos, quanto para os peptídios com as informações depositadas no GenBank. Esses fragmentos de RAPD caracterizaram-se por seqüências de caráter genético dominante e específico para cada biótipo, uma vez que, foram sempre identificados em várias populações de *B. tabaci* de ambos os biótipos.

A partir de todas essas informações a respeito das seqüências dos fragmentos de RAPD correspondentes aos biótipos de *B. tabaci*, foram desenhados *primers* específicos para a elaboração de reações de SCAR que fossem específicas a cada biótipo (Tabela 21).

Tabela 21 – Sequência de *primers* para reações de PCR específicas para os biótipos de *B. tabaci*.

<i>Primer</i>	Sequência 5' → 3'	nt	Tm
BT-B1	(F) CGC AGA ATG TCT CAC TGC A	19	63,0 °C
	(R) GCG GCA CCT TGT TGA CAG A	19	
BT-B3	(F) GCA CCC ACG GAC ATT GAA AT	20	63,0 °C
	(R) CCC ACT GTA TCC TTC GTC TCT	21	
BT-BR1	(F) GGC GTG TTC CGC GAA TTC TGA	21	63,5 °C
	(R) CCG AAC CCT TTG GTG GAG GAT	21	

Uma vez definidas as condições de reação, os *primers* foram testados contra os biótipos de *B. tabaci* por meio de PCR. Observou-se que as condições definidas para cada *primer* resultaram em produtos de amplificação correlacionados especificamente para cada biótipo de mosca branca em estudo. Quando testou-se o *primer* BT-B1 para a identificação do biótipo B de *B. tabaci* observou-se um produto de PCR de 800 pb específico para o biótipo B. Esse fragmento não foi identificado nas reações de PCR quando foram utilizadas amostras de DNA do biótipo BR e de *Anticarsia gemmatalis* para a verificação da especificidade desse *primer* (Figura 31).

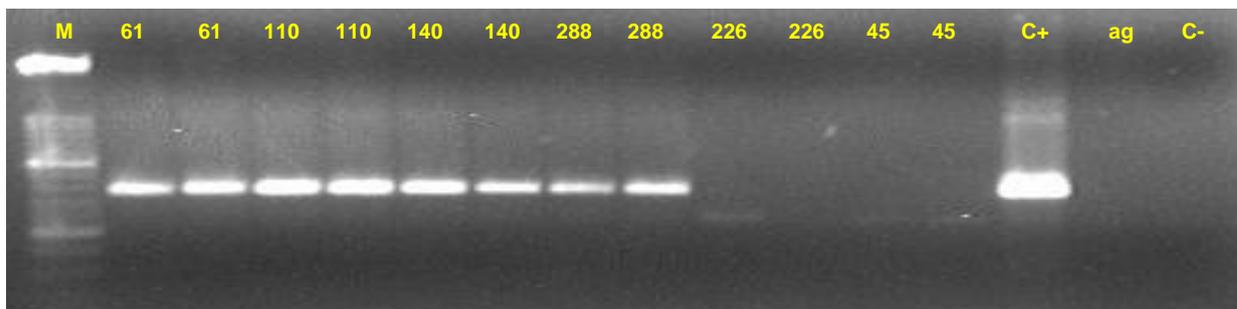


Figura 31 – Reações de SCAR utilizando-se o *primer* BT-B1 para a detecção do biótipo B de *B. tabaci*. Os códigos 61, 110, 140 e 288 correspondem às amostras da coleção biológica de referência de insetos identificadas como *B. tabaci* biótipo B; as amostras 226 e 45 são amostras dessa mesma coleção identificadas como sendo o biótipo BR. O código C+ corresponde ao fragmento de RAPD clonado no vetor pGEM-T; ag indica o DNA de *A. gemmatalis*; C- Corresponde ao controle negativo feito com água. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder.

Após o estabelecimento dos parâmetros para a realização das reações de SCAR e a confirmação da especificidade para o biótipo B de mosca branca, esse *primer* foi testado contra as amostras de DNA de insetos pertencentes a outras espécies de mosca branca ou, gêneros ou, famílias de artrópodos. Os resultados indicaram que o conjunto de *primers* de SCAR BT-B1 foi específico para a detecção do biótipo B, não havendo sítios de anelamento para essa seqüência de DNA em outros grupos de insetos (Figura 32).

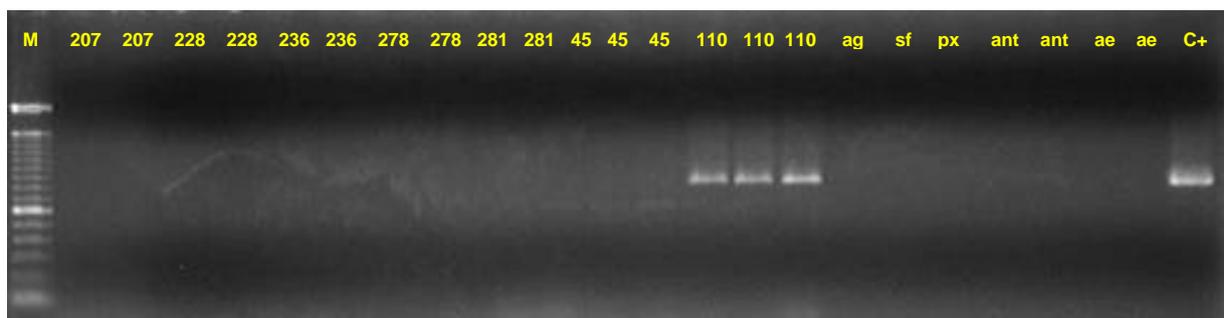


Figura 32 – Reações de SCAR utilizando-se o *primer* BT-B1 para a detecção do biótipo B de *B. tabaci* entre várias amostras de insetos de diferentes famílias ou gêneros. Os códigos indicam: 207, *A. cocois*; 228, *A. aepim*; 236, *B. tuberculata*; 278, *A. woglumi*; 281, *T. vaporariorum*; 45, *B. tabaci* biótipo BR; 110, *B. tabaci* biótipo B; ag, *A. gemmatalis*; sf, *S. frugiperda*; ant, *A. grandis*; ae, *A. aegypti*. O código C+ corresponde ao fragmento de RAPD clonado no vetor pGEM-T. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder.

Em seguida, o conjunto BT-B1 foi testado contra outros biótipos de *B. tabaci* para a observação da especificidade de detecção do biótipo B quando comparado com outros biótipos de mosca branca (Figura 33).

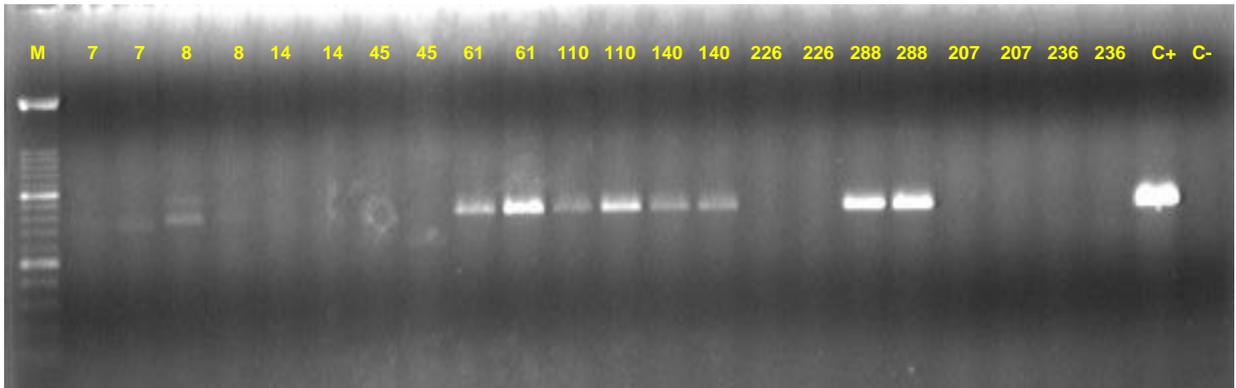


Figura 33 – Uso do *primer* BT-B1 para a detecção do biótipo B quando comparado com outros biótipos de *B. tabaci*. Os números 7, e 14 indicam o biótipo Q; 8, biótipo cassava; 45 e 226 representam o biótipo BR; 61, 110, 140 e 288 são o biótipo B. Os controles usados foram: 207, *A. aepim* e; 236, *B. tuberculata*. O código C+ corresponde ao fragmento de RAPD clonado em plasmídeo; C- Corresponde ao controle negativo feito com água. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder.

Os resultados indicaram a presença do fragmento de 800 pb apenas para as amostras relacionadas com o biótipo B. Para os biótipos BR, Q e cassava não houve sinal de amplificação definido que pudesse ser reconhecido como o marcador SCAR.

Uma vez estabelecidas as condições e especificidades do primeiro conjunto de *primers*, denominado BT-B1, testou-se a especificidade de um outro conjunto de *primers*, denominado BT-B3, para a identificação do biótipo B de *B. tabaci*. Utilizando-se esse conjunto, observou-se um produto de PCR de 600 pb presente nas amostras de *B. tabaci* identificadas como sendo o biótipo B. Esse produto de PCR não foi detectado nas reações de PCR que utilizaram o DNA de insetos pertencentes a outras famílias, gêneros ou espécies de aleirodídeos, como também, em outras famílias de insetos (Figura 34).

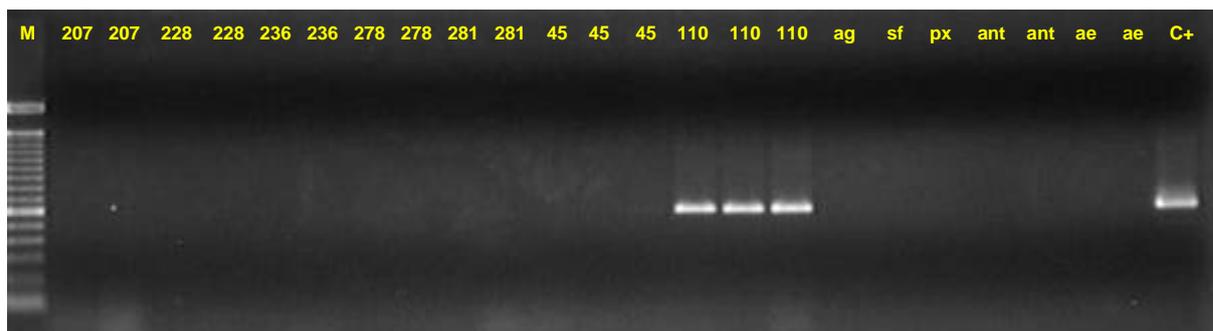


Figura 34 – Reações de SCAR com o *primer* BT-B3. Os números indicam: 207, *A. cocois*; 228, *A. aepim*; 236, *B. tuberculata*; 278, *A. woglumi*; 281, *T. vaporariorum*; 45, *B. tabaci* biótipo BR; 110, *B. tabaci* biótipo B; ag, *A. gemmatalis*; sf, *S. frugiperda*; px, *P. xylostella*; ant, *A. grandis*; ae; *A. aegypti*; C+, seqüência do *primer* BT-B3 clonada em vetor plasmidial. A letra M refere-se ao marcador de massa molecular 100 pb ladder.

Confirmada a especificidade do conjunto BT-B3 em detectar apenas o biótipo B quando comparado com outras espécies de insetos, realizou-se nova reação de PCR utilizando-se DNA's extraídos de populações de mosca branca *B. tabaci* definidas como sendo os biótipos BR e Q para a confirmação da capacidade desse jogo de *primers* em discriminar um determinado biótipo dentro de um grupo tão complexo quanto o gênero *Bemisia*. Os resultados indicaram similaridades no padrão de amplificação entre os biótipos B e Q (Figura 35).

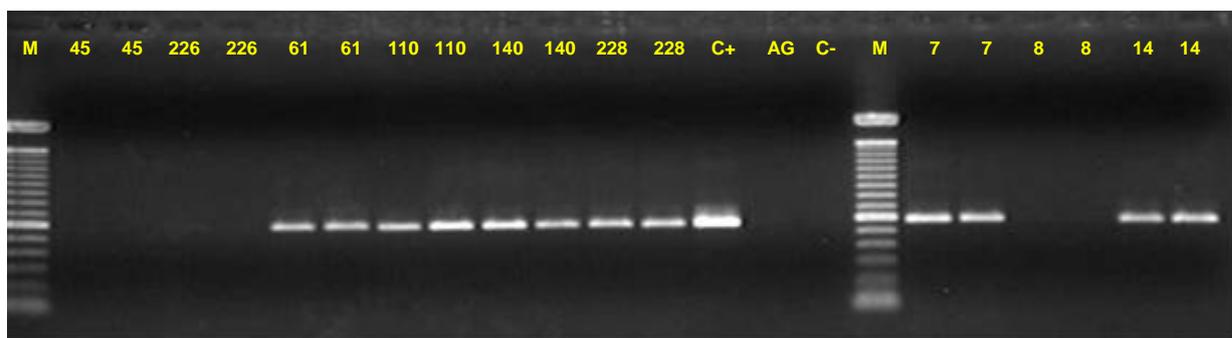


Figura 35 – Teste do *primer* BT-B3 para a detecção do biótipo B quando comparado com outros biótipos de *B. tabaci*. Os números 45 e 226 representam o biótipo BR; 61, 110, 140 e 288 são o biótipo B; 7, e 14 indicam o biótipo Q; 8, biótipo cassava; ag indica o DNA de *A. gemmatalis*; O código C+ corresponde ao fragmento de RAPD clonado em plasmídeo; C- Corresponde ao controle negativo feito com água. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder.

O conjunto BT-B3 permitiu identificar o biótipo B pelo padrão de amplificação de 600 pb sendo capaz de diferenciá-lo do biótipo BR. Entretanto, observou-se que duas amostras identificadas como o biótipo Q amplificaram o mesmo fragmento de DNA.

Utilizando marcadores SCAR para a detecção de *T. vaporariorum*, Agusti *et al.* (2000) descreveram uma reação cruzada entre os marcadores SCAR desenhados para *T. vaporariorum* com os biótipos B e Q de *B. tabaci*. Os autores se apoiaram no fato de que essa reação cruzada possa ser devida à existência de regiões internas comuns a ambas as espécies, o que favorece o anelamento inespecífico dos *primers* de SCAR originalmente desenhados para *T. vaporariorum*.

A partir do estudo das relações filogenéticas entre os biótipos de *B. tabaci* por meio de marcadores moleculares gerados pela técnica de AFLP, Cervera *et al.* (2000) descreveram a relação filogenética entre alguns dos biótipos de *B. tabaci* como sendo: 1) K (Paquistão), H (Índia), II (Paquistão), M (Turquia) e I (Paquistão); 2) Q (Espanha), Cowpea (Nigéria) e B (Espanha); 3) A (Arizona) e; 4) S (Espanha) e Cassava (Nigéria). Dos resultados obtidos pelos marcadores AFLP observou-se que os biótipos B e Q apresentaram uma maior proximidade filogenética sendo estes agrupados em um mesmo clado. Alternativamente, outros marcadores moleculares foram analisados para a determinação de possíveis diferenças moleculares entre os biótipos B e Q.

Horowitz *et al.* (2005) citando informações dos trabalhos de Guirao *et al.* (1997) e Rosell *et al.* (1997) descrevem que no sudeste europeu e no oriente médio, os dois biótipos de maior distribuição são os biótipos B e Q. O biótipo B tem a maior distribuição geográfica e é considerado um biótipo invasor relativamente recente. O biótipo Q foi considerado originalmente restrito à península ibérica mas, recentemente, tem se estabelecido em outros países do mediterrâneo, conjuntamente com o biótipo B (Horowitz *et al.*, 2003). A partir da análise das seqüências dos genes da citocromo oxidase mitocondrial (mtCOI) dos biótipos B e Q, Horowitz *et al.* (2005) demonstraram a similaridade entre estas seqüências de DNA e, ao mesmo tempo, a existência de polimorfismo inter-seqüência entre estes biótipos usando a técnica de PCR-RFLP a partir da amplificação do DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) de ambos os biótipos seguindo-se a digestão com a enzima de restrição *VspI*. Com essa estratégia, obteve-se um fragmento de massa molecular de 800 pb que foi amplificado a partir do gene da citocromo oxidase I (COI) mitocondrial em ambos os biótipos. Submetendo-se esses fragmentos de mesma massa molecular ao PCR-RFLP, foram obtidos perfis de restrição diferenciados, sendo gerados fragmentos de 350 pb para o biótipo Q e de 50 pb para o biótipo B.

A partir das informações geradas da amplificação da região ITS 1 rDNA mitocondrial, Rabello *et al.* (2005) obtiveram um fragmento de 550 pb que foi digerido com as enzimas de restrição *Ava*I, *Dde*I e *Sau*3A. Dos resultados obtidos, observou-se que os biótipos B e Q apresentaram o mesmo perfil de digestão. A seguir, foi gerado um dendrograma a partir dos perfis de PCR-RFLP com as enzimas citadas anteriormente, revelando elevada similaridade genética (aproximadamente 100 %) entre esses dois biótipos de mosca branca.

Moya *et al.* (2001), citando os resultados de Ronda *et al.* (1999), observaram a possibilidade de troca de material genético em condições de laboratório entre os biótipos B e Q, originando híbridos B/Q. Essas informações reforçam a possibilidade da existência de regiões de DNA comuns a esses biótipos, resultando no compartilhamento de marcadores moleculares. Essa hipótese parece ser consistente com o observado para o marcador SCAR BT-B3 que foi capaz de amplificar o fragmento de 600 pb a partir do DNA extraído dos biótipos B e Q. Provavelmente, existem sítios de anelamento comuns para os *primers* BT-B3 presentes em áreas do DNA desses dois biótipos, resultando também a geração do produto de PCR no biótipo Q.

Em seguida foram analisadas as especificidades do conjunto de *primers* BT-BR1 em detectar o biótipo BR de *B. tabaci* quando comparado com amostras de DNA extraídas de insetos pertencentes a outros gêneros ou famílias (Figura 36).

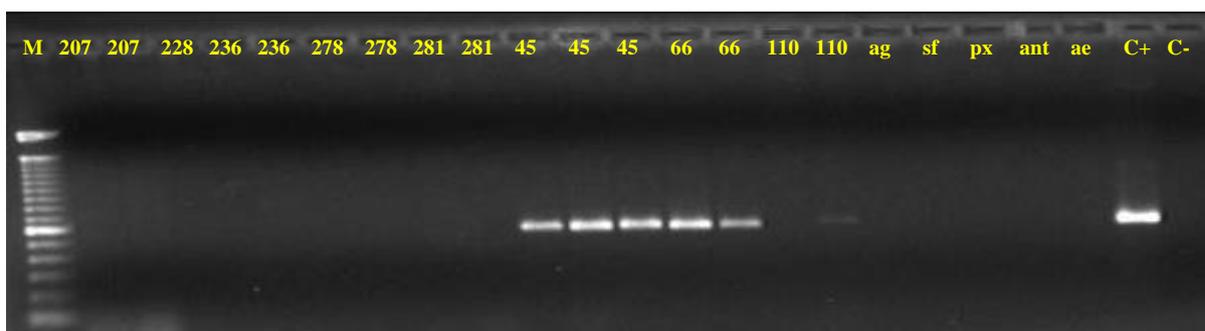


Figura 36 – Reações de SCAR com o *primer* BT-BR1. Os números indicam: 207, *A. cocois*; 228, *A. aepim*; 236, *B. tuberculata*; 278, *A. woglumi*; 281, *T. vaporariorum*; 45 e 66, *B. tabaci* biótipo BR; 110, *B. tabaci* biótipo B; ag, *A. gemmatalis*; sf, *S. frugiperda*; px, *P. xylostella*; ant, *A. grandis*; ae; *A. aegypti*; C+, seqüência do *primer* BT-BR1 clonada no vetor pGEM-T; C-, Corresponde ao controle negativo feito com água. A letra M refere-se ao marcador de massa molecular 100 pb ladder.

Utilizando-se os DNA's extraídos de várias ordens e famílias de insetos, observou-se a presença de um fragmento de PCR de aproximadamente 700 pb apenas nas amostras previamente identificadas como sendo o biótipo BR de *B. tabaci*. Dessa forma, determinou-se o potencial desse *primer* de SCAR em identificar o biótipo BR entre várias outras amostras de insetos. A próxima etapa consistiu em se determinar o poder desse *primer* de PCR em discriminar o biótipo BR entre outros biótipos de *B. tabaci* (Figura 37).

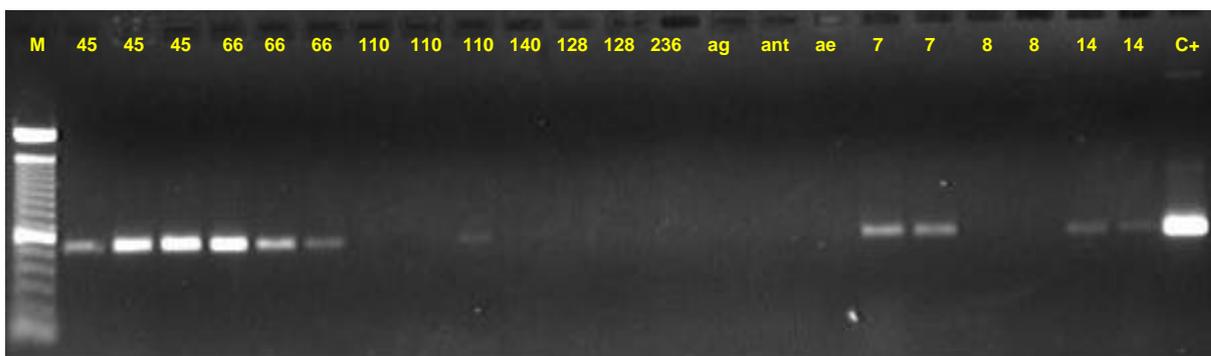


Figura 37 – Teste do *primer* BT-BR1 para a detecção do biótipo BR quando comparado com outros biótipos de *B. tabaci*. Os números 45 e 66 representam o biótipo BR; 110, 128 e 140 são o biótipo B; 236, *B. tuberculata*; 7, e 14 indicam o biótipo Q; 8, biótipo cassava; ag, *A. gemmatilis*; ant, *A. grandis*; ae, *A. aegypti*; O código C+ corresponde ao fragmento de RAPD clonado em plasmídio. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder.

Do resultado obtido, observou-se que o conjunto BT-BR1 permitiu identificar o biótipo BR pelo padrão de amplificação característico, sendo capaz de diferenciá-lo do biótipo B. Entretanto, observou-se que duas amostras identificadas previamente como o biótipo Q, também produziram o mesmo fragmento de DNA. Dessa forma, estabeleceu-se um método molecular para a detecção desse biótipo em *commodities* interceptadas onde haja a suspeita da presença desse inseto. Além disso, após a introdução do biótipo B nas culturas do Brasil, deixou-se de detectar o biótipo BR nas amostras coletadas em vários pontos do país. Fazendo o uso desse *kit* diagnóstico abre-se a possibilidade de se estabelecer uma estratégia, por meio molecular, para a detecção, determinação de novos

nichos ecológicos e tentativa de recuperação desse biótipo de *B. tabaci*. O perfil de amplificação cruzado com o biótipo Q reforça, mais uma vez, a proximidade genética desse biótipo com os biótipos do Novo Mundo. Maiores estudos precisam ser realizados para se estabelecer bases mais sólidas para a compreensão do grau de proximidade filogenética que existe entre os biótipos B, BR e Q.

Para a confirmação dos perfis moleculares obtidos pelos conjuntos BT-B1 e BT-B3, foram selecionadas, ao acaso, amostras de DNA de diferentes insetos para a realização de um RAPD com o *primer* OPA-13 para a verificação da qualidade das amostras de DNA's utilizadas nas reações de SCAR (Figura 38).

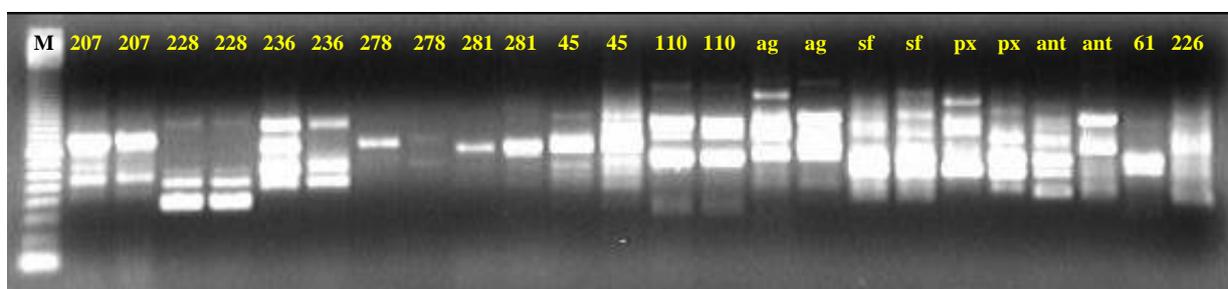


Figura 38 – Perfis de marcadores RAPD obtidos com o primer OPA-13 a partir de amostras de diferentes espécies de insetos. Os códigos indicam: 207, *A. cocois*; 228, *A. aepim*; 236, *B. tuberculata*; 278, *A. woglumi*; 281, *T. vaporariorum*; 45, *B. tabaci* biótipo BR; 110, *B. tabaci* biótipo B; ag, *A. gemmatalis*; sf, *S. frugiperda*; px, *P. xylostella*; ant, *A. grandis*; 61, controle para o biótipo B; 226, controle para o biótipo BR. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder.

Em função dos perfis eletroforéticos de RAPD que foram obtidos com os diversos insetos, confirma-se a especificidade dos marcadores SCAR, descartando-se qualquer possibilidade de que impurezas presentes nas amostras de DNA tenham exercido influência nos resultados obtidos.

A eficiência dos *primers* BT-B1 e BT-B3 foi testada sob diferentes condições para a determinação dos limites mínimos de uso desses marcadores para a detecção e o monitoramento do biótipo B de *B. tabaci*. Usando-se partes seccionadas do biótipo B como vestígios foi possível a sua identificação molecular. O mesmo resultado também foi observado quando foram comparados machos e fêmeas (Figura 39).

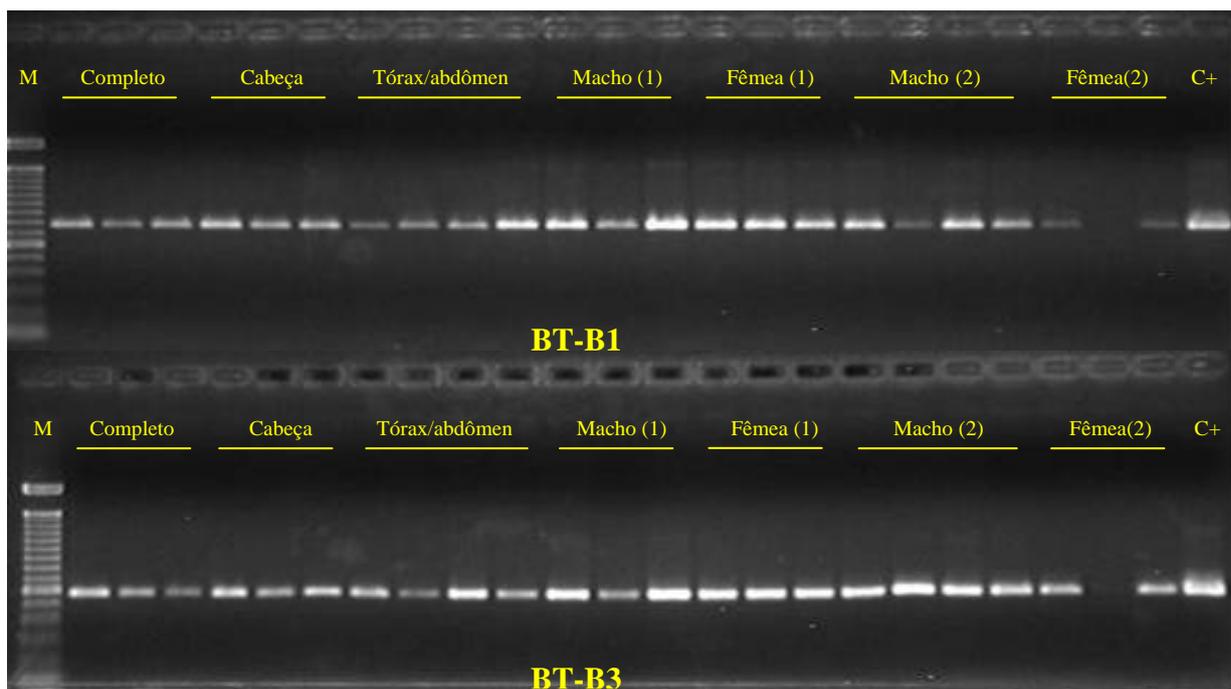


Figura 39 – Teste de eficiência dos *primers* BT-B1 e BT-B3 para a detecção do biótipo B de *B. tabaci* a partir de vestígios do inseto como também quando comparados com machos e fêmeas. O número 1 indica amostras de mosca branca que foram coletadas em tomate em casa de vegetação e, o número 2, insetos coletados em tomate em campo. O código C+ corresponde ao fragmento de RAPD clonado no vetor pGEM-T. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder.

Como esperado, foram obtidos os perfis moleculares de 800 pb e 600 pb com os conjuntos BT-B1 e BT-B3 a partir dos vestígios do inseto. Esse resultado reforça o potencial de uso dos marcadores SCAR em identificar o biótipo B de *B. tabaci* a partir de fragmentos do mesmo. Essa aplicação é particularmente importante quando da interceptação de *commodities* em que seja constatada a presença de fragmentos de mosca branca que impeçam a sua identificação por parte do entomólogo.

Utilizando-se o DNA extraído a partir de machos e fêmeas de uma mesma população nas reações de PCR com os conjuntos BT-B1 e BT-B3, foi possível detectar os marcadores SCAR de 800 pb e 600 pb em todos os indivíduos da população. Isto se deve ao fato de que uma das estratégias reprodutivas dessa espécie seja a partenogênese arrenótoca, ou seja, a geração de machos a partir de ovócitos não fecundados permitindo então que esses marcadores sejam herdados como alelos de origem materna. Essa

propriedade aumenta ainda mais o espectro de aplicabilidade dos marcadores moleculares SCAR, indicando o seu uso independentemente do sexo do inseto. Os marcadores SCAR poderão fornecer, dessa forma, uma ferramenta complementar ao trabalho de identificação do biótipo B de mosca branca, mesmo quando a amostra se encontrar em condições mínimas de fornecer dados para a sua caracterização e identificação.

Para a determinação das quantidades de DNA contaminante que poderiam interferir na detecção molecular de uma amostra de *B. tabaci*, adicionou-se diferentes proporções de DNA de *A. gemmatalis* em amostras de DNA dos biótipos B e BR de *B. tabaci*. Utilizando-se os *primers* BT-B1 e BT-B3 foi possível detectar o biótipo B em altas proporções de contaminação com DNA exógeno (Figura 40).

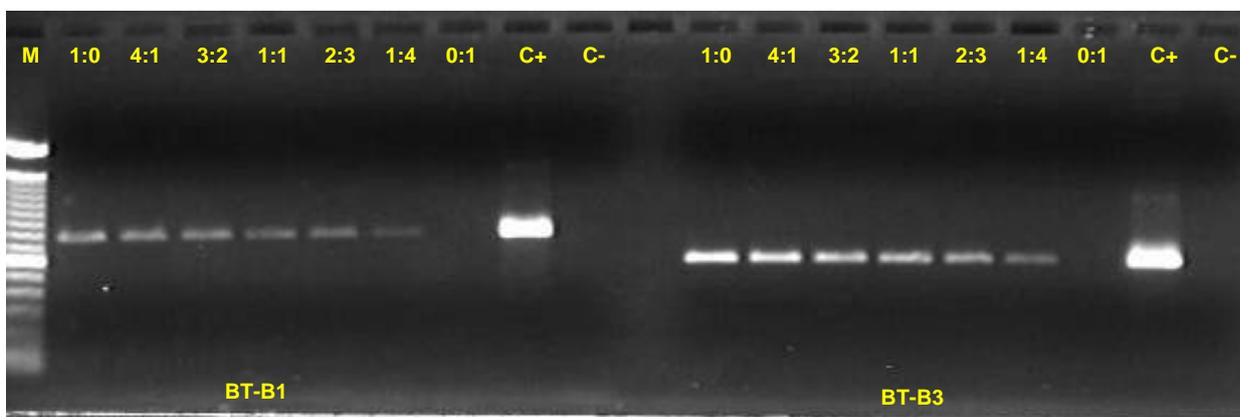


Figura 40 – Teste de determinação das quantidades máximas de contaminação em uma amostra de DNA do biótipo B de *B. tabaci* ainda viável para a identificação molecular com os *primers* de SCAR BT-B1 e BT-B3. Os números indicam as proporções de DNA de *B. tabaci* em relação a *A. gemmatalis*. O código C+ corresponde aos fragmentos de RAPD clonados no vetor pGEM-T; C-, Corresponde ao controle negativo feito com água. A letra M refere-se ao marcador de massa molecular 100 pb ladder.

Para o *primer* BT-B1 observou-se o sinal de amplificação correspondente a 800 pb até na proporção de 1:4 de DNA de *A. gemmatalis*. O mesmo resultado foi observado com o *primer* BT-B3. Esses resultados reforçam a especificidade e o potencial de uso desses *primers*, mesmo na presença de DNA contaminando a amostra a ser identificada pela estratégia molecular usando marcadores SCAR.

O mesmo procedimento foi aplicado ao estudo do *primer* BT-BR1 para a determinação dos níveis de contaminação com DNA exógeno suficiente para interferir na identificação do biótipo BR de *B. tabaci*. O *primer* BT-BR1 mostrou-se específico em detectar o referido biótipo de mosca branca mesmo em altas concentrações de DNA contaminante (Figura 41).

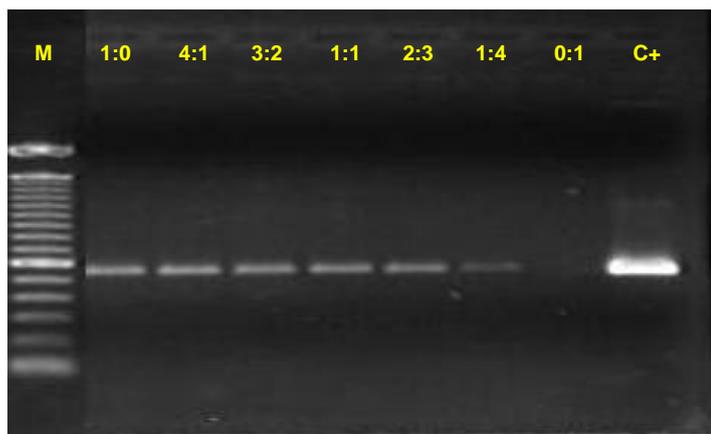


Figura 41 – Teste de determinação das quantidades máximas de contaminação em uma amostra de DNA do biótipo BR de *B. tabaci* ainda viável para a identificação molecular com o *primer* de SCAR BT-BR1. Os números indicam as proporções de DNA de *B. tabaci* em relação a *A. gemmatalis*. O código C+ corresponde aos fragmentos de RAPD clonados no vetor pGEM-T; C-, Corresponde ao controle negativo feito com água. A letra M refere-se ao marcador de massa molecular 100 pb ladder.

Os resultados indicaram que, mesmo em altas proporções de DNA contaminante (1:4), foi possível a identificação molecular da amostra do biótipo BR de *B. tabaci*. A alta especificidade dos três *primers* de SCAR reforça a importância do uso desses marcadores na detecção dos biótipos B e BR de *B. tabaci* como uma estratégia molecular para estudos de rastreabilidade visando medidas fitossanitárias para o controle da entrada dos biótipos de mosca branca em áreas de importância agrícola, minimizando os impactos produzidos pela entrada de pragas exóticas.

A partir das informações obtidas, novos testes foram realizados para a detecção do biótipo B de *B. tabaci* sob diferentes condições experimentais. Dos resultados obtidos,

observou-se que os *primers* BT-B1 foram capazes de identificar as amostras de mosca branca sob diferentes condições de monitoramento (Figura 42).

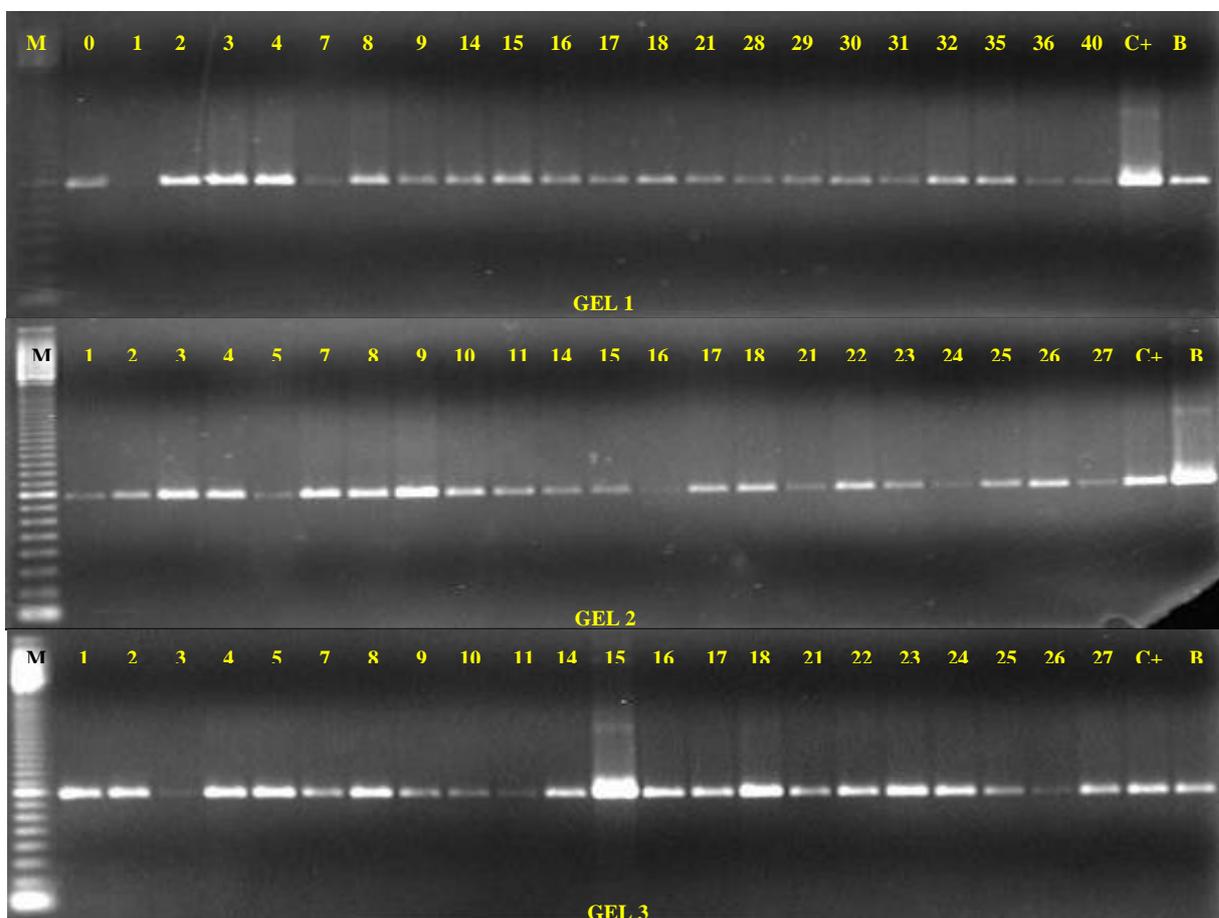


Figura 42 – Detecção do biótipo B de *B. tabaci* sob diferentes condições de monitoramento. Gel 1 - monitoramento sem fixação em etanol a 25 °C; Gel 2 - monitoramento com fixação em etanol a 25 °C; Gel 3 - monitoramento sem fixação a 45 °C. Os números indicam os dias de monitoramento; C+ corresponde ao fragmento de RAPD clonado no vetor pGEM-T; B, controle para o biótipo B; A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder.

Nas diferentes condições testadas foi possível detectar o fragmento de 800 pb ao longo dos 30 dias de monitoramento. Esse resultado reforça o potencial de uso desse marcador molecular em detectar o biótipo B de mosca branca sob diferentes temperaturas e sob a ação ou não de agentes fixadores.

Entretanto, quando do monitoramento das amostras de mosca branca sem fixação em etanol e depositas em solo a 45 °C, não foi detectada a banda de 800 pb característica

para o biótipo B. Esse resultado pode ser devido ao fato da ação da microbiota do solo, decompondo rapidamente os insetos componentes da amostra. Além disso, este resultado pode ser devido a interferência provocada pelas substâncias constituintes do solo presentes nas amostras de DNA. A inibição da reação de PCR por amostras extraídas de solo foi observada por Tsai & Olson (1992a). Resultado similar também foi relatado por Romanowski *et al.* (1993), indicando a presença de substâncias contaminantes do solo nas amostras de DNA. Estes pesquisadores concluíram que as substâncias de solo interferem com a atividade da *Taq* polimerase, impedindo a amplificação do DNA molde. Quantidades mínimas destes componentes (nanogramas) podem interferir com a reação de PCR (Tsai & Olson, 1992b).

Uma vez definidas as condições de uso dos marcadores SCAR e os seus limites de utilização, estes foram aplicados a uma rotina de identificação. Amostras de mosca branca provenientes de localidades do estado do Maranhão foram analisadas com esses *kits* diagnóstico. Primeiramente realizou-se a identificação molecular com o *kit* diagnóstico BT-B1 (Figura 43).

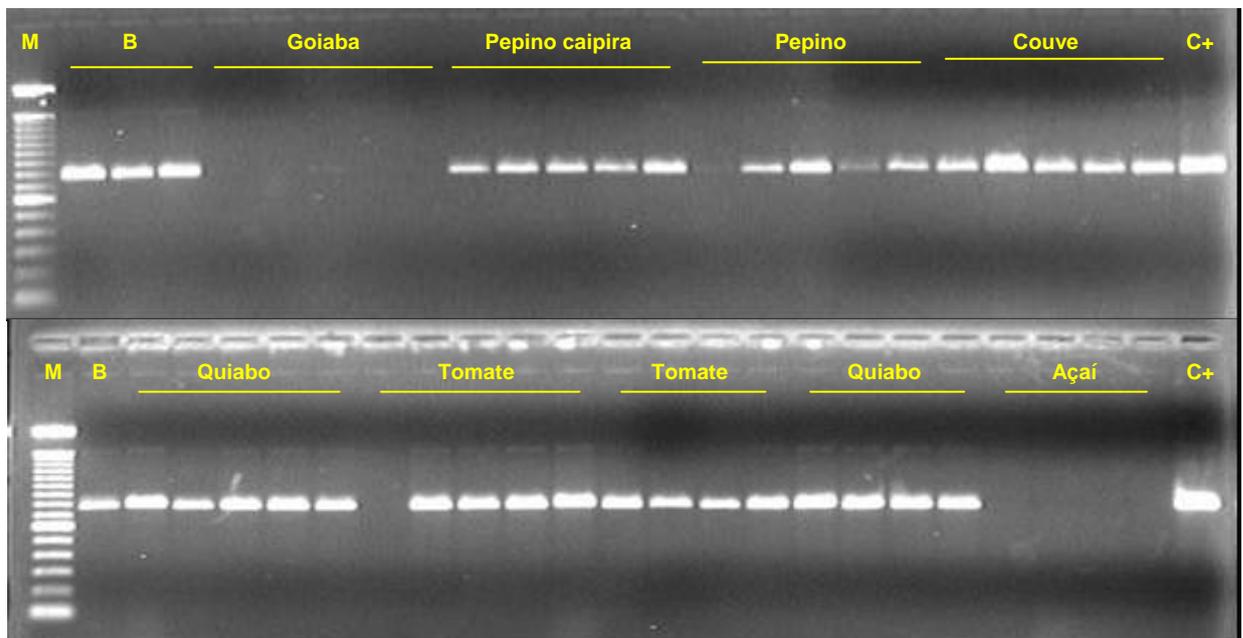


Figura 43 – Identificação do biótipo B de *B. tabaci* em rotina de laboratório empregando-se o *kit* diagnóstico BT-B1 a partir de amostras coletadas em localidades do estado do Maranhão. C+ corresponde ao fragmento de RAPD clonado no vetor pGEM-T; B, controle para o biótipo B; A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder.

Empregando-se o *kit* diagnóstico BT-B1 foi possível identificar o biótipo B de *B. tabaci* entre as nove populações de insetos que foram analisadas. Das nove populações que foram testadas, apenas duas culturas (goiaba e açaí) não apresentaram sinal de amplificação correspondente para o biótipo em estudo. As demais populações foram positivas para o sinal de SCAR correspondente, o que foi confirmado pelo uso de uma população previamente identificada como biótipo B.

Prosseguiu-se à confirmação da especificidade desse marcador, submetendo-se as mesmas amostras de DNA a uma amplificação com o *primer* OPA-10 para a detecção do fragmento de RAPD de 800 pb que originou o marcador. Utilizando-se essa estratégia verificou-se variações nos perfis moleculares entre as populações coletadas em goiaba e açaí (Figura 44).

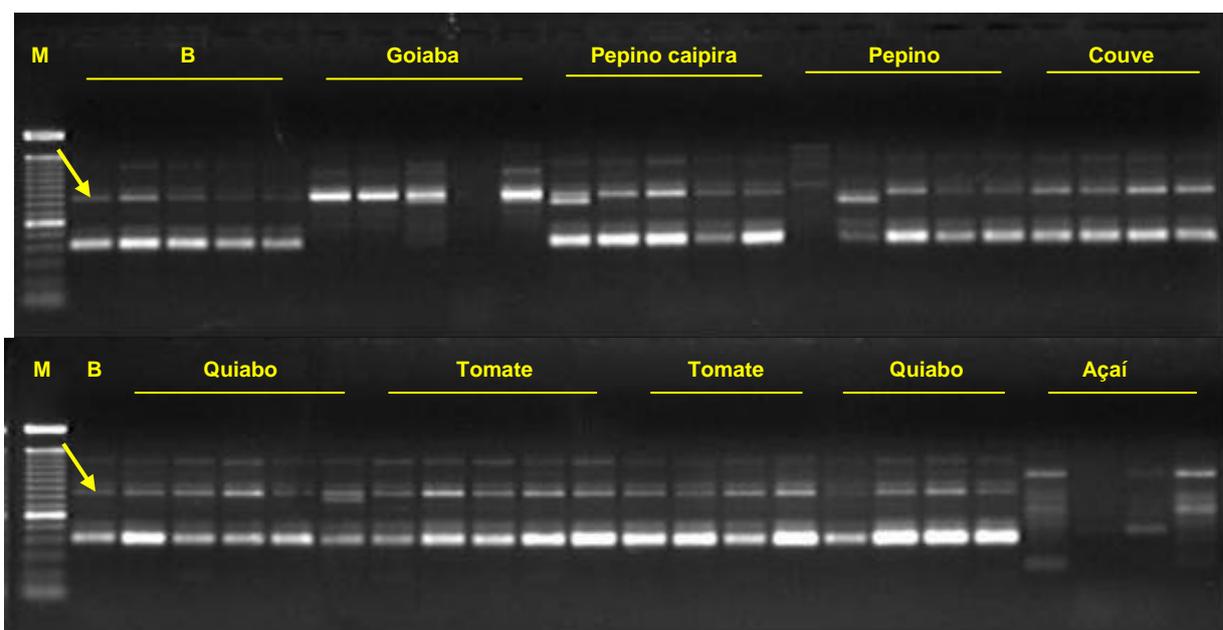


Figura 44 – Perfil de marcadores RAPD obtidos com o *primer* OPA-10 a partir de amostras coletadas em localidades do Maranhão. A letra B corresponde ao controle para o biótipo B e a A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder. A seta indica o fragmento de RAPD que originou o marcador BT-B1.

Com essa estratégia identificou-se o fragmento de RAPD de 800 pb nas populações de mosca branca que produziram resultado positivo para o biótipo B com o conjunto BT-B1. Entretanto, a população de aleirodídeo coletada em cultura de goiaba produziu uma

banda de DNA na mesma faixa das populações de *B. tabaci*. Esse sinal, inclusive, foi mais intenso do que aquele originalmente identificado no biótipo B. Confirma-se com esse resultado a eficiência dos marcadores SCAR na identificação específica do biótipo B, uma vez que, mesmo a população de insetos coletados em goiaba produziram esse fragmento de 800 pb, provavelmente, não existe o sítio de anelamento para os *primers* de SCAR nessa amostra. Para a população coletada em açaí o perfil eletroforético foi diferente, produzindo uma banda de 1100 pb característica para essa amostra.

A mesma estratégia foi então aplicada ao conjunto BT-B3 para a confirmação da especificidade em se identificar o biótipo B de *B. tabaci*. Os resultados obtidos com o *primer* BT-B1 foram observados com o *primer* BT-B3 (Figura 45).

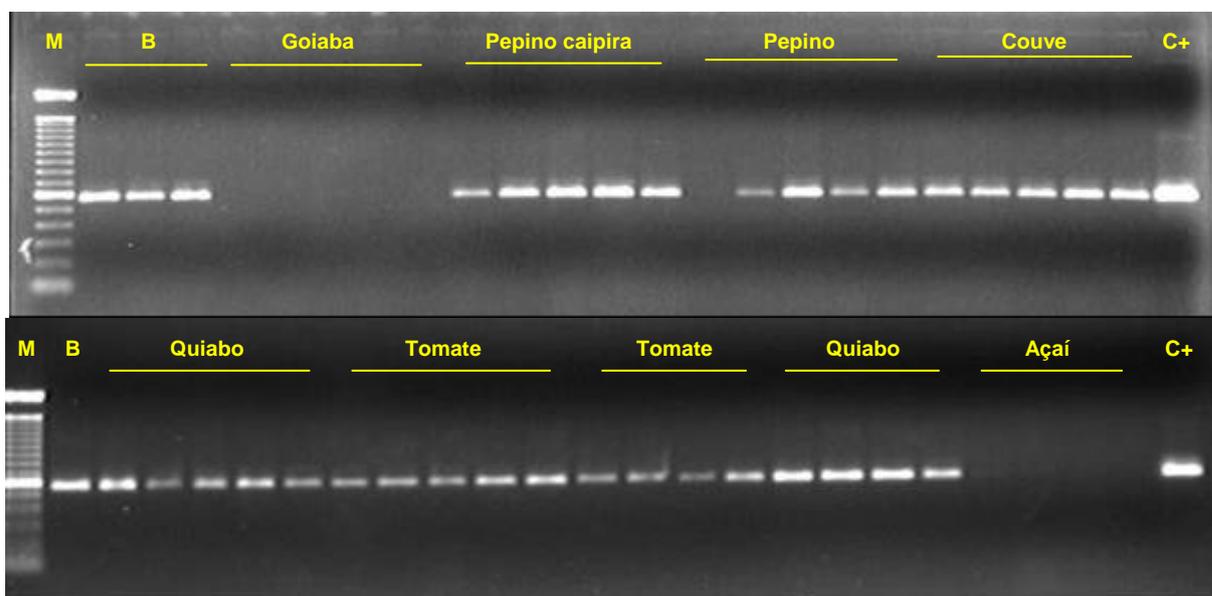


Figura 45 – Identificação do biótipo B de *B. tabaci* em rotina de laboratório empregando-se o *kit* diagnóstico BT-B3 a partir de amostras coletadas em localidades do estado do Maranhão. C+ corresponde ao fragmento de RAPD clonado no vetor pGEM-T; B, controle para o biótipo B; A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder.

Das nove populações submetidas a análise molecular com o *primer* de SCAR BT-B3, confirmou-se a presença do biótipo B de *B. tabaci* em sete amostras. As populações coletadas em goiaba e açaí não produziram o sinal de amplificação de 600 pb, característico daquele biótipo.

A partir dos resultados obtidos, realizou-se uma reação de amplificação de RAPD com o *primer* OPA-13 para a identificação do fragmento de 600 pb. Empregando-se esse *primer*, foram observadas diferenças entre os perfis eletroforéticos produzidos pelas diversas amostras estudadas (Figura 46).

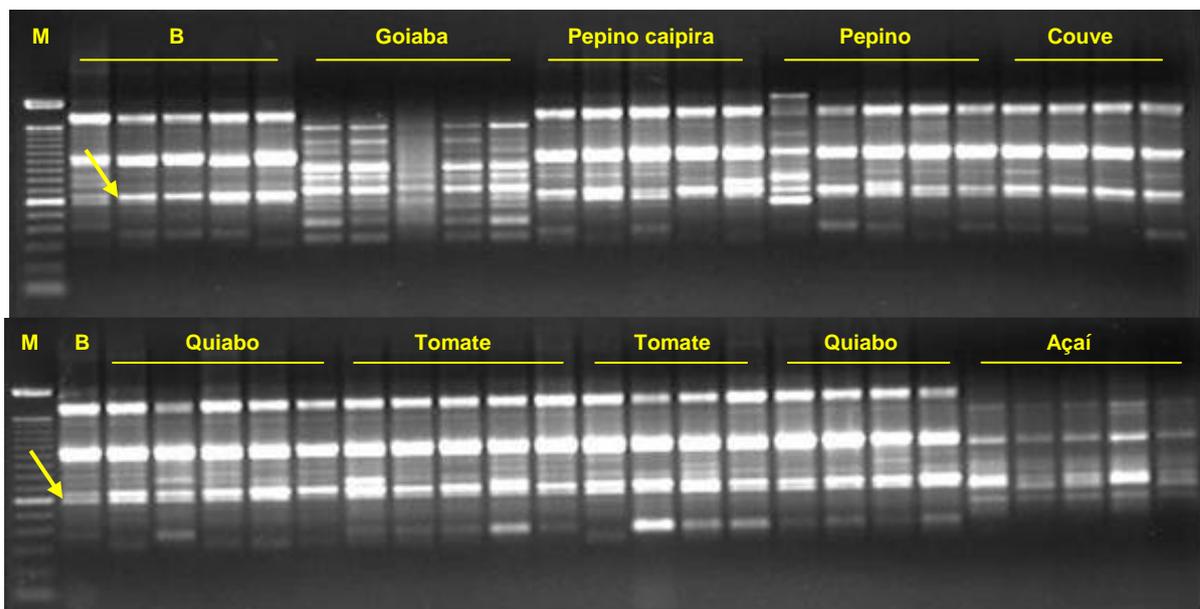


Figura 46 – Perfil de marcadores RAPD obtidos com o *primer* OPA-13 a partir de amostras coletadas em localidades do Maranhão. A letra B corresponde ao controle para o biótipo B e a letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder. A seta indica o fragmento de RAPD que originou o marcador BT-B3.

As reações de RAPD com o *primer* OPA-13 produziram o fragmento de 600 pb que foi identificado nas amostras de *B. tabaci* biótipo B que foram amplificadas com o conjunto BT-B3. As populações coletadas em goiaba produziram um perfil de DNA diferenciado em relação às populações identificadas como sendo o biótipo B de *B. tabaci*, não existindo o fragmento de 600 pb. Contudo, a amostra coletada em açaí produziu um forte sinal de amplificação na região aproximada de 600 pb. O elemento diferenciador dessa população em relação ao biótipo B foi a ausência de um fragmento de massa molecular de 1500 pb comum em todos os indivíduos caracterizados como sendo biótipo B. Esse resultado demonstra a eficiência dos marcadores SCAR na identificação específica do biótipo B, uma vez que, mesmo a amostra de insetos coletados em açaí produz um

fragmento de 600 pb, provavelmente, não existe o sítio de anelamento para os *primers* de SCAR nessa população.

Agusti *et al.* (1999) descrevem o desenvolvimento de marcadores SCAR para a detecção de *Helicoverpa armigera* no intestino de possíveis predadores. Um fragmento de 1200 pb resultante da amplificação por RAPD usando o DNA de *H. armigera* permitiu o desenho de três conjuntos de *primers* sendo que dois desses foram capazes de detectar vestígios de *H. armigera* no intestino médio do seu predador *Dicyphus tamaninii* mesmo após 4 h da ingestão dos ovos de *H. armigera*.

A mesma estratégia aplicada para *H. armigera*, foi aplicada por Agusti *et al.* (2000) para estudos com *Trialeurodes vaporariorum* para detectar vestígios dessa mosca branca no intestino do predador *D. tamaninii*. A partir de um fragmento de 2400 pb gerado por RAPD e presente apenas em *T. vaporariorum*, foram gerados dois jogos de *primers* sendo que, apenas um foi capaz de detectar essa mosca branca no intestino do seu predador. Como esperado, o marcador SCAR foi identificado em todos os estágios de vida da mosca branca. Nesse mesmo trabalho pôde ser feita uma comparação entre os marcadores de natureza bioquímica e os baseados em DNA. Utilizando-se anticorpos monoclonais para vitelina, uma proteína expressa apenas em ovos de *T. vaporariorum*, os autores relataram a ineficiência dos anticorpos anti-vitelina em detectar predadores *D. tamaninii* positivos quando estes se alimentaram de ninfas de mosca branca. Repetindo-se o mesmo experimento utilizando-se os marcadores SCAR foi possível detectar o DNA da presa em 60 % dos predadores após 4 h da ingestão de ninfas de *T. vaporariorum*. Além disso, é observada na análise sorológica a presença de resultados falso-negativos em função da quantidade de antígeno ingerido pelo predador. Assim, o emprego de anticorpos monoclonais pode resultar em análise subestimada do processo de predação ou de seleção de possíveis predadores em virtude desse marcador bioquímico ser estágio específico. O DNA, por sua vez, não sofre variações ao longo do ciclo de vida da presa e, dessa forma, *primers* de SCAR desenhados para *T. vaporariorum*, podem ser usados para detectar a presa em qualquer estágio do seu ciclo de vida (ovo, ninfa ou adulto) no intestino de predadores. Com o emprego de marcadores SCAR é possível a seleção de potenciais insetos predadores para emprego em programas de manejo integrado de pragas.

Uma vez estabelecidos os *primers* de SCAR para *B. tabaci*, experimentos de igual magnitude poderão ser estabelecidos para a identificação e a seleção de possíveis predadores para o controle dessa importante praga. Então, mais uma possível aplicação dos marcadores SCAR é apresentada para auxiliar no entendimento das relações ecológicas

que são estabelecidas por essa praga com outros organismos, visando o emprego em programas de controle biológico.

Existem várias vantagens para o uso dos marcadores SCAR na análise molecular de insetos: a) não necessitam de grandes quantidades de DNA com alto grau de pureza se comparado com outras técnicas como, por exemplo, os métodos de hibridação requeridos pelo RFLP; b) a análise dos resultados é mais simples do que outros métodos baseados em DNA, tais como, RAPD e AFLP. Os marcadores SCAR são revelados por PCR simples, não necessitando digestão com enzimas de restrição; c) a informação genômica pode ser obtida diretamente pela análise dos produtos de PCR. Estes marcadores oferecem um método mais prático para a varredura de um número elevado de amostras em um curto intervalo de tempo e dispensam etapas laboriosas; d) oferecem também um ponto de partida para a clonagem de genes que estejam compreendidos na sequência do marcador (Kethidi *et al.*, 2003).

A partir das informações disponibilizadas, entende-se que a utilização da técnica de RAPD, como em qualquer técnica molecular, apresenta limitações e é justamente por isso, que são continuamente vasculhadas novas regiões do genoma dos organismos visando a identificação de *loci* mais vantajosos do ponto de vista técnico e molecular. Nesse aspecto, a técnica de RAPD cumpre com o seu papel, uma vez que, são possíveis, com poucos *primers*, varrer um número muito superior de *loci* no genoma do organismo-alvo quando comparado com outras técnicas, fornecendo o ponto de partida para o desenvolvimento de novos marcadores mais específicos quando não se conhece, em sua totalidade, o genoma do organismo de estudo. Complementar às informações produzidas pelos marcadores RAPD, a conversão destes em marcadores mais específicos, tais como, o SCAR permite aumentar ainda as possibilidades de desenvolvimento de novas estratégias moleculares para o entendimento da dinâmica, ecologia e biologia das populações em estudo. Essa visão é particularmente importante para *B. tabaci*, praga de distribuição global que apresenta variações entre os seus biótipos. O desenvolvimento de marcadores específicos para cada biótipo é uma etapa decisiva para o estabelecimento de estratégias baseadas em DNA para a detecção e prevenção da entrada de novos biótipos no Brasil, minimizando os riscos provocados pela entrada de insetos exóticos no agro-ecossistema brasileiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, H., Harada, T., Kanebara, M., Shimada, T., Ohbayashi, F. e Oshiki, T. (1998). Genetic mapping of RAPD markers linked to the densonucleosis refractiveness gene, *nsd-1*, in the silkworm, *Bombyx mori*. **Genes Genet. Syst.**, 73, 237-242.

Agusti, N., De Vicente, M. C. e Gabarra, R. (1999). Development of sequence amplified characterized region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new polymerase chain reaction-based technique for predator gut analysis. **Molecular Ecology**, 8, 1467-1474.

Agusti, N., de Vicente, M. C. e Gabarra, R. (2000). Developing SCAR markers to study predation on *Trialeurodis vaporariorum*. **Insect Molecular Biology**, 9 (3), 263-268.

Behura, S. K., Sahu, S. C., Rajamani, S., Devi, A., Mago, R. Nair, S. e Mohan, M. Differentiation of asian rice gall midge, *Orseolia oryzae* (Wood-Mason), byotypes by sequence characterized amplified regions (SCARs). **Insect Molecular Ecology**, 8 (3), 391-397.

Borém, A. e Dos Santos, F. R. (2002). Marcadores moleculares. In: Biotecnologia simplificada. Editora Suprema: Viçosa-MG. 249 p.

Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davis, R. V. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet.**, 32, 314-331.

Cervera, M. T., Cabezas, J. A., Simon, B., Martinez-Zapater, J. M., Beitia, F. e Cenis, J. L. (2000). Genetic relationship among biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemíptera: Aleyrodidae) based on AFLP analysis. **Bulletin of Entomological Research**, 90, 391-396.

Guirao, P. Beitia, F e Cenis, J. L. (1997). Biotype determination in Spanish populations of *Bemisia tabaci* (Hemíptera: Aleyrodidae). **Bulletin of Entomological Research**, 87, 587-593.

Horowitz, A. R., Kontsedalov, S. Khasdan, V e Ishaaya, I. (2005). Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. **Archieve of Insect Biochemistry and Physiology**, 58, 216-225.

Jain, A., Ariyadasa, R., Kumar, A. Srivastava, M. N., Mohan, M e Nair, S. (2004). Tagging and mapping of a rice gall midge resistance gene, *Gm8*, and development of SCARs for use in marker-aided selection and gene pyramiding. **Theor. Appl. Genet.**, 109, 1377-1384.

Jeffreys, A. J., Wilson, V., Thein, S. L. (1985). Hypervariable 'minisatelite' regions in human DNA. **Nature**, 316, 76-79.

Kethidi, D. R., Roden, D. B., Ladd, T. R., Krell, P. J., Retnakaran, A. e Feng, Q. (2003). Development of SCAR markers for the DNA-based detection of the asian long-horned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky). **Archives of insect Biochemistry and Physiology**, 52, 193-204.

Litt, M. e Luty, J.A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.**, 44, 388-396.

Malgorn, Y. e Coquoz, R. (1999). DNA typing for identification of some species of Calliphoridae. An interest in forensic entomology. **Forensic Science International**, 102, 111-119.

Manguin, S., Kengne, P., Sonnier, L., Harbach, R. E., Baimai, V. Trung, H. D. e Coosemans, M. (2002). SCAR markers and multiplex PCR-based identification of isomorphic species in the *Anopheles dirus* complex in Southeast Asia. **Medical and Veterinary Entomology**, 16, 46-54.

Milach, S. C. K. (2005). Marcadores de DNA. Aplicações no melhoramento de plantas. <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio05/marcadoresdna.pdf> acesso em 23/12/2005.

Monnerat, R.G., Leal-Bertioli, S., Bertioli, D., Butt, T. e Bordat, D. (2004). Variabilidade Genética do Parasitóide *Diadegma* sp. através de RAPD-PCR. **Horticultura Brasileira**, 22 (1), 90-92.

Moya, A., Guirao, P., Cifuentes, D., Beitias, F. e Cenis, J. L. (2001). Genetic diversity of Iberian populations of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) based on random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. **Molecular Ecology**, 10, 891-897.

Paran, I. e Michelmore, R. W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theor. Appl. Genet.**, 85, 985-993.

Queiroz, P. R., Martins, E. S., Monneratt, R. G. e Lima, L.H.C. (2004). Análise da variabilidade de uma população de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) por meio de marcadores moleculares RAPD. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, 75, 18 p.

Rabello, A. R., Queiroz, P. R., Simões, K. C., Hiragi, C. O., Lima, L. H. C., Oliveira, M. R. V. e Mehta, A. (2005). Diferenciação de biótipos de *Bemisia tabaci* utilizando PCR-RFLP e sequenciamento da região ITS1 rDNA. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 95, 24 p.

Romanowski, G., Lorenz, M. G. e Wackernagel, W. (1993), Use of polymerase chain reaction and electroporation of *Escherichia coli* to monitor the persistence of extracellular plasmid DNA introduced into natural soils. **Appl. Environ. Microbiol.**, 59(10), 3438-3446.

Ronda, M., Adán, A., Cifuentes, D., Cenis, J. L. e Beitia, F. (1999). Laboratory evidence of interbreeding between biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) present in Spain. **Abstracts VII international Plant Virus Epidemiology Symposium**, Aguadulce (Almería), pp. 83-84.

Rosell, R. C., Bedford, J. D., Frohlich, D. R., Brown, J. K. e Markham, P. G. (1997). Analysis of morphological variation in distinct populations of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, 90, 575-589.

Simon, J. C., Letreame, N. e Latorre, A. (1999). Molecular markers linked to breeding system differences in segregating and natural populations of the cereal aphid *Rhopalosiphum padi* L. (1999). **Molecular Ecology**, 8, 965-973.

Tsai, Y. -L. e Olson, B. H. (1992a). Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. **Appl. Environ. Microbiol.**, 58, 754-757.

Tsai, Y. -L. e Olson, B. H. (1992b). Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments by polymerase chain reaction. **Appl. Environ. Microbiol.**, 58, 2292-2295.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. e Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18, 6531-6535,

## Conclusão Geral

A importância econômica da mosca branca *B. tabaci* como praga vem se expandindo em todo o mundo, inclusive na agricultura brasileira. Essa espécie pode ser encontrada em quase todas as regiões do mundo em virtude da sua grande adaptabilidade e resistência a pesticidas. Essas características biológicas vêm favorecendo a sua dispersão, sobrevivência em várias localidades e o seu amplo espectro de plantas hospedeiras, incluindo espécies vegetais daninhas, ornamentais e agrícolas.

Dos resultados obtidos nos experimentos de identificação molecular, foi possível observar a rápida dispersão do biótipo B para todas as unidades da federação e, em função da elevada diversidade genética, obtida pelas análises moleculares, ressalta-se a complexidade da espécie *B. tabaci*. Além disso, os resultados obtidos dos estudos de população sugerem que dentro do biótipo B, possa haver distinções entre os indivíduos de acordo com a cultura predada. Provavelmente, a variabilidade genética encontrada nas populações de *B. tabaci* biótipo B possa ser o reflexo da estratégia reprodutiva adotada pela espécie para superar condições adversas, tais como, a pressão provocada por substâncias químicas. Sendo assim, a cultura predada pelos indivíduos não influenciaria diretamente na dinâmica dos marcadores moleculares na população. Os efeitos combinados da baixa frequência de migração em associação com o efeito clonal produzido pela atividade partenogenética da espécie podem ser as responsáveis pela identificação de perfis moleculares específicos em cada amostra analisada. Os ciclos de reprodução podem ser estratégias adotadas para a garantia do estabelecimento da população em uma dada cultura e para promover o aumento de variabilidade quando em condições de pressão de seleção. Esses eventos somados podem ser os responsáveis pela considerável variação dentro de um mesmo biótipo.

Dos dados obtidos ao longo do estudo observa-se a extrema complexidade da espécie *B. tabaci*. Essa complexidade se revelou na caracterização molecular, onde as análises de agrupamento pelo programa NTSys-pc indicaram, inicialmente, a separação dentro do biótipo B de *B. tabaci* em função das culturas hospedeiras.

Fazendo-se uma análise pormenorizada dos dados anteriores, por meio das determinações de variância molecular (AMOVA), estas revelaram que a maior fonte de variabilidade era originária de diferenças entre as populações do que em relação a variações dentro das populações.

Esse fenômeno pode ser devido a extrema habilidade desse inseto em discernir culturas onde estejam presentes possíveis predadores. De alguma forma, a fêmea adulta é capaz de avaliar as possíveis culturas que sejam mais seguras para a sua oviposição e instalação da população.

Somado-se a esse fator está ainda a capacidade de *B. tabaci* selecionar a espécie hospedeira. Em função de ser uma espécie generalista, *B. tabaci* é capaz de selecionar, provavelmente, por estímulos sensoriais, as espécies vegetais hospedeiras mais adequadas para a oviposição e que forneçam os melhores recursos para a manutenção da sua prole.

Além disso, existe ainda, a possibilidade de interferência no processo de corte quando machos de mais de um biótipo coabitam um mesmo local de nutrição. Nesse processo, o macho de um biótipo interfere no comportamento sexual de acasalamento, resultando em uma alteração na proporção entre machos e fêmeas dentro da população daquele biótipo.

Outro fator que não pode ser desprezado é a ação dos produtos químicos que atuam selecionando populações cada vez mais resistentes em uma determinada localidade.

Em virtude de todas essas variáveis, um modelo plausível para se tentar entender o comportamento de *B. tabaci* na seleção de suas plantas hospedeiras poderia ser esquematizado na figura 47.

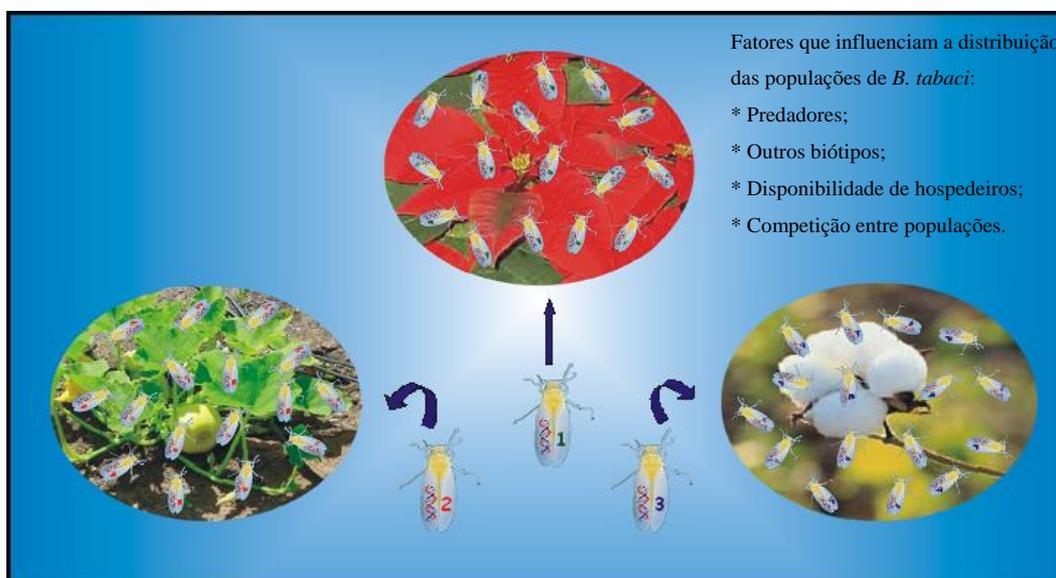


Figura 47 – Modelo descritivo para a dispersão e a instalação de populações de *B. tabaci* biótipo B em diferentes culturas distribuídas em várias áreas geográficas. Os números indicam as populações de um mesmo biótipo de *B. tabaci*. O sinal indica a presença do marcador molecular detectado pela técnica de SCAR.

Nesse modelo poderia se propor um comportamento para o estabelecimento das populações de *B. tabaci* em uma determinada região geográfica. A população colonizadora inicial seria representada por diferentes fêmeas, cada uma pertencendo ao biótipo B de *B. tabaci*, mas com sutis diferenças em alguns de seus marcadores moleculares. A partir desse ponto, as fêmeas fariam uma avaliação da relação custo-benefício na escolha de uma determinada cultura hospedeira. Essa relação levaria em consideração questões tais como, presença de ácaros predadores em uma determinada cultura, a influência da presença na região de monoculturas ou não e a interferência provocada por outros biótipos da mesma espécie, já presentes, na planta hospedeira. Em virtude dessa tomada de decisão, as fêmeas da população colonizadora inicial poderiam se separar e, cada uma, se estabelecer em uma determinada planta hospedeira seja planta daninha, ornamental ou de interesse agrícola. A partir desse estabelecimento inicial, a fêmea seria responsável pela oviposição e estabelecimento de uma população clonal em uma determinada planta hospedeira. Sendo assim, o perfil de marcadores moleculares praticamente não apresentaria variação em virtude da reprodução assexuada. Isso é confirmado pelos perfis de marcadores RAPD que foram observados nas populações analisadas nesse estudo. No dendrograma, essas populações apresentaram elevada similaridade genética intrapopulacional sugerindo, inicialmente, uma diferenciação em função da cultura predada. A análise de AMOVA reforça essa hipótese, pois, foi encontrada maior variação entre populações do que dentro das populações.

Em seguida, pelo tratamento dado a cada cultura seja pela forma de cultivo (orgânica ou não) e pela aplicação de coquetéis de inseticidas, populações resistentes poderiam ser selecionadas reforçando a manutenção de uma população clonal com um perfil de marcador ligeiramente diferente das demais populações do mesmo biótipo. Entretanto, essa variação não seria suficiente para apoiar a suposição da formação de uma nova espécie. O resultado observado nesse estudo seria o efeito das estratégias adotadas pelas fêmeas de *B. tabaci* em função das melhores escolhas de recursos e proteção para o desenvolvimento de sua prole.

Independentemente desses fatos, observou-se, também, que determinados marcadores moleculares de RAPD apresentaram comportamento monomórfico e consistente, sendo encontrados em várias populações de um mesmo biótipo de *B. tabaci* quando coletadas em várias culturas de diferentes localidades do Brasil ao longo de diferentes anos de estudo. Esse dado reforçou então a possibilidade do desenvolvimento de um novo marcador que fosse mais preciso e eficiente do que os marcadores baseados em

RAPD. Esse marcador denominado SCAR caracteriza-se por uma reação de PCR específica para um dado biótipo. A alta sensibilidade dos marcadores SCAR associada com a sua acurácia permitiram o desenvolvimento de ferramentas moleculares seguras para a identificação de biótipos de mosca branca, *B. tabaci*. A partir da identificação de fragmentos de RAPD específicos para os biótipos B e BR de *B. tabaci* foi possível o desenvolvimento de conjuntos de *primers* para a identificação de biótipos de ocorrência no Brasil.

Além disso, esses *primers* mostraram-se específicos para cada biótipo, não havendo sinal de amplificação caso haja a presença de DNA originário de outras espécies de insetos. Dessa forma, foi possível o estabelecimento de testes de identificação de biótipos de *B. tabaci* por meio da técnica de SCAR.

A partir das informações geradas pelos marcadores SCAR foi possível a organização de um fluxograma para a tomada de decisões quanto à identificação molecular dos biótipos de *B. tabaci* (Figura 48).

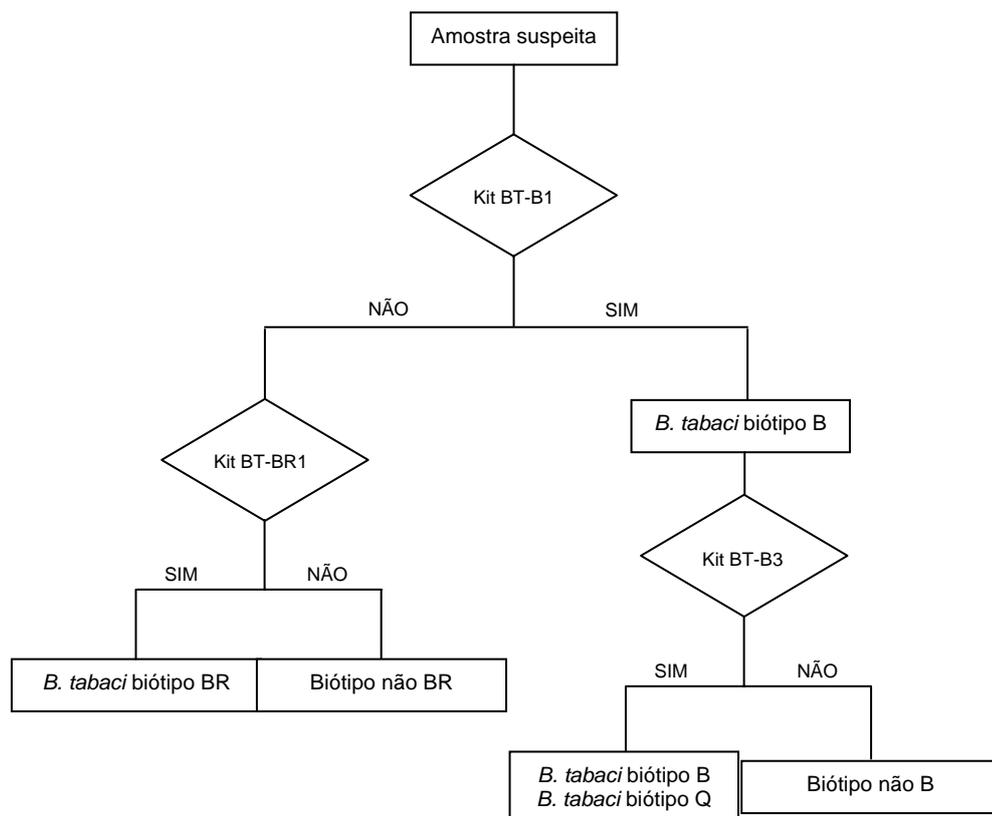


Figura 48 – Fluxograma para a tomada de decisões quanto à utilização dos *primers* de SCAR e para a detecção e a identificação de biótipos de *B. tabaci*.

A vantagem dessa estratégia molecular reside no fato da possibilidade de se reduzir o tempo para a elaboração de laudo quarentenário de 36 h para 12 h. Isso permite então tomadas de decisão mais rápidas para o controle da entrada de *B. tabaci* em áreas ainda livres dessa praga agrícola. Além disso, os marcadores SCAR que foram desenvolvidos permitiram identificar os biótipos B e BR de *B. tabaci* mesmo que ainda não se conheçam todas as características biológicas e comportamentais desse inseto, permitindo identificar com segurança populações de um mesmo biótipo dessa praga quarentenária.