

**Aplicações dos marcadores SCAR na
identificação de biótipos de *Bemisia
tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) sob
diferentes condições de estudo**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 174

Aplicações dos marcadores SCAR na identificação de biótipos de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) sob diferentes condições de estudo

Paulo Roberto Queiroz
Maria de Nazaré Klautau Guimarães
Dulce Maria Sucena da Rocha
Maria Regina Vilarinho de Oliveira
Luzia Helena Corrêa Lima

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*
Membros: *Arthur da Silva Marante*
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*
Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

A 639 Aplicações dos marcadores SCAR na identificação de biótipos de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) sob diferentes condições de estudo. / Paulo Roberto Queiroz ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
26 p. : il. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 174)

1. *Bemisia tabaci*. 2. Marcador molecular. 3. SCAR. I. Queiroz, Paulo Roberto. II. Série.

632.96 – CDD 21.

Aplicações dos marcadores SCAR na identificação de biótipos de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) sob diferentes condições de estudo

Paulo Roberto Queiroz¹

Maria de Nazaré Klautau Guimarães²

Dulce Maria Sucena da Rocha³

Maria Regina Vilarinho de Oliveira⁴

Luzia Helena Corrêa Lima⁵

Resumo

Os marcadores RAPD são caracterizados pela facilidade de manipulação e o seu menor custo, embora sejam de resultados menos consistentes. Uma alternativa é a conversão dos fragmentos de RAPD em SCAR permitindo o desenvolvimento de marcas mais precisas, fornecendo então ferramentas moleculares para a diferenciação de biótipos dentro de uma espécie, tais como, a mosca branca *Bemisia tabaci*. O objetivo do trabalho foi verificar as condições de aplicação dos marcadores SCAR para a detecção dos biótipos B e BR de *B. tabaci* a partir da seleção dos fragmentos de RAPD específicos para cada biótipo. Condições para obtenção dos marcadores SCAR foram definidas os marcadores obtidos foram submetidos a diferentes testes para a determinação dos limites de uso do método. 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*, como também, análises para a determinação de quais condições seriam favoráveis para a detecção dos marcadores SCAR. O desenvolvimento de marcadores específicos para a identificação de cada um dos biótipos de *B. tabaci* é uma etapa decisiva no estabelecimento de estratégias baseadas em DNA

¹ Professor, Pesquisador Dr., da Faculdade de Ciências da Saúde, do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB. CEP 70.000-000, Brasília, DF. E.mail:

queiroz@cenargen.embrapa.br

² Professora, Pesquisadora Dra., do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, CEP. 70.910-900, Brasília, DF. E.mail:

nklautau@unb.br

³ Professora, Pesquisadora Dra., da Faculdade da Universidade de Brasília, Planaltina (FUP) CEP. 73.300-000, Brasília, DF. E.mail: dmsrocha@unb.br

⁴ Pesquisadora Dra., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cx. Postal 02372, CEP 70.849-970, Brasília, DF. E.mail: vilarin@cenargen.embrapa.br

⁵ Pesquisadora Dra. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cx. Postal 02372, CEP 70.849-970, Brasília, DF. E.mail: luzia@cenargen.embrapa.br

para que se possa minimizar os riscos provocados pela entrada de insetos exóticos no agro-ecossistema brasileiro.

Palavra-chave: *Bemisia tabaci*; SCAR

Abstract

The RAPD markers are characterized by the easiness manipulation and their smallest cost, although they are of less solid results. An alternative is the conversion of the fragments of RAPD in SCAR, allowing the development of molecular tools for differentiation of the biotypes of species, such as, the whitefly *Bemisia tabaci*. The objective of the work was to verify the conditions of application of the SCAR markers for the detection of the biotypes B and BR of *B. tabaci*, starting from the selection of specific fragments of RAPD for each biotype. Conditions for obtaining of the SCAR markers were defined and the markers obtained were submitted to different tests for the determination of the limits of use of the method. The consistence tests revealed the efficiency and the specificity of the primers, identifying the biotype B in varied conditions. That way, it was possible the establishment of tests for identification of biotypes of *B. tabaci*, as well as, the determination of which conditions would be favorable for the detection of the SCAR markers. The development of specific markers for the identification of each one of the biotypes of *B. tabaci* is a decisive stage in the establishment of strategies based in DNA so; it can minimize the risks provoked by the entrance of exotic insects in the Brazilian agriculture-ecosystem.

Key word: *Bemisia tabaci*; SCAR

Introdução

Os marcadores moleculares são regiões do DNA que permitem diferenciar dois ou mais indivíduos, uma vez que, estes são herdados geneticamente. Os distintos tipos de marcadores moleculares, hoje disponíveis, diferenciam-se pela tecnologia utilizada em revelar variações do DNA e assim, detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e reprodutibilidade. Além disso, as tecnologias de marcadores moleculares estão evoluindo rapidamente e modificações já existem com relação às aplicações como; na caracterização molecular de insetos e nas estratégias de identificação dos mesmos quando interceptados durante o intercâmbio de *commodities* entre países produtores de insumos agropecuários (Milach, 2005).

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.

Dessa forma, marcadores identificados por amplificação, especialmente RAPD, são mais fáceis de se manipular e de custo menor, embora sejam de resultados menos consistentes. A técnica requer menores quantidades de DNA, não envolvendo o emprego de sondas radioativas, não necessita de informações prévias da sequência de DNA da espécie estudada e demanda menos mão-de-obra. 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, fragmentos produzidos 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 (Borém e Santos, 2002).

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 estejam disponíveis a 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 às mudanças nas condições de amplificação e representa marcadores codominantes, de maior reprodução (Kethidi *et al.*, 2003).

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 dos mesmos, 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 de 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. platanooides*, *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 sequência 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 que se possa entender a ecologia desses insetos vetores na introdução de métodos efetivos de controle. A partir dos marcadores de RAPD foram desenhados e combinados seis *primers* de marcadores 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.

METODOLOGIA

OBTENÇÃO DE DNA A PARTIR DE *Bemisia tabaci*

Para a utilização nas estratégias moleculares, o DNA foi obtido macerando-se cinco fêmeas adultas e individualizadas de *B. tabaci* em 60µL de tampão de extração (Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1mM, Triton X-100 0,3% e proteinase K 60µg.mL⁻¹). O macerado foi incubado por 15min a 65°C, seguindo-se fervura durante 5min. 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 instar 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).

REAÇÃO DE RAPD

As reações de amplificação foram realizadas em 30µL de uma mistura contendo 24,9µL de água milliQ autoclavada, 3,0µL de tampão 10X (Tris-HCl 60mM pH 8,8, KCl 500mM e

MgCl₂ 20mM, Amersham, CA, USA), 1,2μL do *primer* OPA-13 (5' CAGCACCCAC 3', Operon Technologies, Inc.) na concentração de 10μM, 0,6μL de dNTP 10mM, 0,3μL de *Taq* DNA polimerase (Amersham, CA, USA) e 4μL de DNA (20ng).

CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO POR RAPD

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

REAÇÕES DE SCAR UTILIZANDO O *Primer* BT-B1

As reações de amplificação foram realizadas em 25μL de uma mistura contendo 11,1μL de água milliQ autoclavada, 2,5μL de tampão 10X (100mM Tris-HCl pH 9,2, 500mM KCl e 1% Tween 20), 1,5μL MgCl₂ 25mM, 1,5μL de cada *primer* (F: 5'CGCAGAATGTCTCACTGCA3' e R: 5'GCGGCACCTTGTGACAGA3', IDT, Inc., Coralville, IA) na concentração de 3μM, 1,2μL DMSO, 0,3μL dNTP 10mM, 0,4μL *Taq* DNA polimerase (Amersham) 1U.μL⁻¹ e 5,0μL de DNA (20ng).

Utilizou-se como controle negativo 5μL de água milliQ autoclavada e, como controle positivo, 5μL (4ng.μL⁻¹) do plasmídio pBEM-B1 contendo a sequência que originou o desenho dos *primers* de SCAR BT-B1 (GenBank accession # EF210443).

REAÇÕES DE SCAR UTILIZANDO O *Primer* BT-B3

As reações de amplificação foram realizadas em 25μL de uma mistura contendo 12,3μL de água milliQ autoclavada, 2,5μL de tampão 10X (100mM Tris-HCl pH 9,2, 500mM KCl e 1% Tween 20), 1,5μL MgCl₂ 25mM, 1,5μL de cada *primer* (F: 5'GCACCCACGGACATTGAAAT3' e R: 5'CCCACTGTATCCTTCGTCTCT3', IDT, Inc., Coralville, IA) na concentração de 1μM, 0,3μL dNTP 10mM, 0,4μL *Taq* DNA polimerase (Amersham) 1U.μL⁻¹ e 5,0μL de DNA (20ng).

Utilizou-se como controle negativo 5 μL de água milliQ autoclavada e, como controle positivo, 5μL (4ng.μL⁻¹) do plasmídio pBEM-B7 contendo a sequência que originou o desenho dos *primers* de SCAR BT-B3 (GenBank accession # EF210450).

REAÇÕES DE SCAR UTILIZANDO O *Primer* BT-BR1

As reações de amplificação foram realizadas em 25 μ L de uma mistura contendo 11,8 μ L de água milliQ autoclavada, 2,5 μ L de tampão 10X (100mM Tris-HCl pH 9,2, 500mM KCl e 1% Tween 20), 1,5 μ L MgCl₂ 25mM, 0,5 μ L DMSO, 1,5 μ L de cada *primer* (F: 5'GGCGTGTTCCGCGAATTCTGA3' e R: 5'CCGAACCCTTTGGTGGAGGAT3', IDT, Inc., Coralville, IA) na concentração de 1,0 μ M, 0,3 μ L dNTP 10mM, 0,4 μ L *Taq* DNA polimerase (Amersham) 1U. μ L⁻¹ e 5,0 μ L de DNA (20ng).

Utilizou-se como controle negativo 5 μ L de água milliQ autoclavada e, como controle positivo, 5 μ L (4ng. μ L⁻¹) do plasmídio pBEM-BR2 contendo a seqüência que originou o desenho dos *primers* de SCAR BT-BR1 (GenBank accession # EF210451).

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 3min a 94°C, programado para 30 ciclos de desnaturação de 1min a 94°C, anelamento por 1min a 63°C e extensão por 1min a 72°C e uma etapa final de extensão de 5min 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 3min a 94°C, programado para 30 ciclos de desnaturação de 1 min a 94°C, anelamento por 1min a 63,5°C e extensão por 1min a 72°C e uma etapa final de extensão de 5min 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 μ L ou 60 μ L 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 1).

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 1 – 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. gemmatilis* 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 72h 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 3h a -20°C sob as seguintes condições de monitoramento: 1. 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 24h, 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 2) 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 2 – 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 90mM e EDTA 1mM) durante 3h a 160V. Ao término da corrida, os géis foram corados por 30min em uma solução corante contendo brometo de etídio ($5\mu\text{g.mL}^{-1}$), descorados por 30min em água destilada e fotografado sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 300nm. A documentação fotográfica foi feita usando-se o sistema EagleEye II still video system™ (Stratagene).

Em todos os géis, marcadores de massa molecular (Ladder 100bp - 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

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 comparados machos e fêmeas (Figura 1).

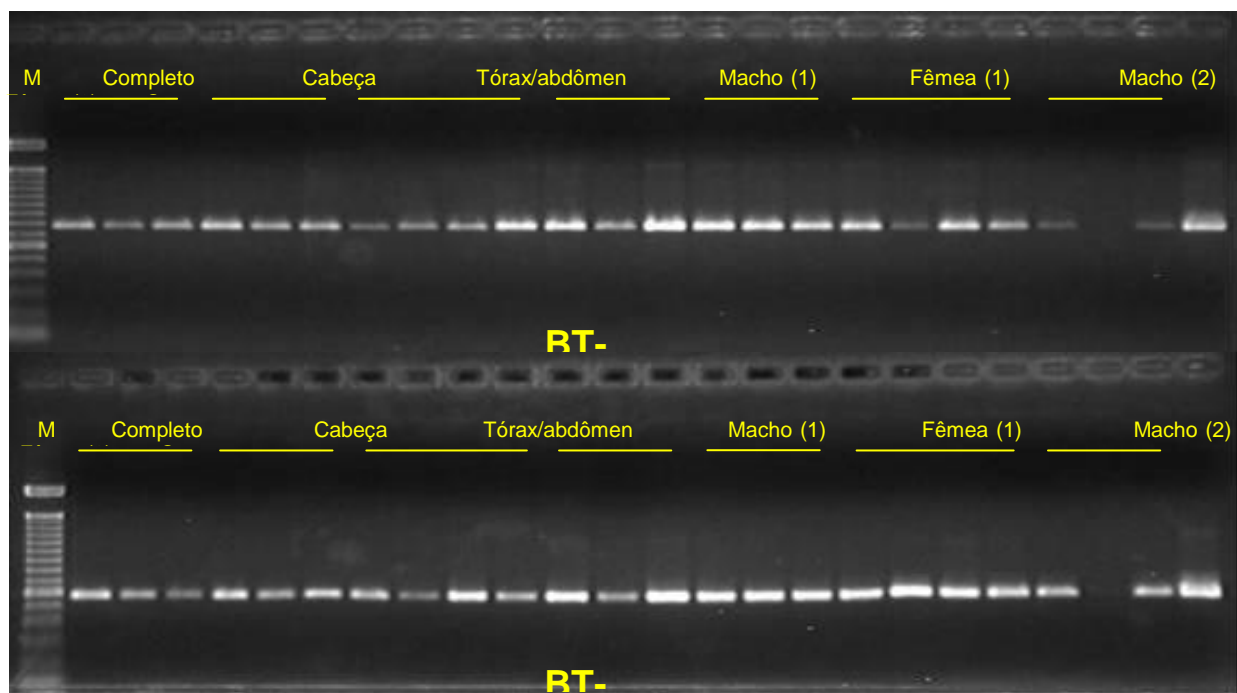


Figura 1 – Teste de eficiência dos *primers* BT-B1 e BT-B3 para a detecção do biótipo B de *B. tabaci* a partir de vestígios do inseto como também quando comparados com machos e fêmeas. O número 1 indica amostras de mosca branca que foram coletadas em tomate em casa de vegetação e, o número 2, insetos coletados em tomate em campo. O código C+ corresponde aos fragmentos de RAPD clonados nos plasmídios pBEM-B1 e pBEM-B7, respectivamente. 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 para 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*, adicionaram-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 2).

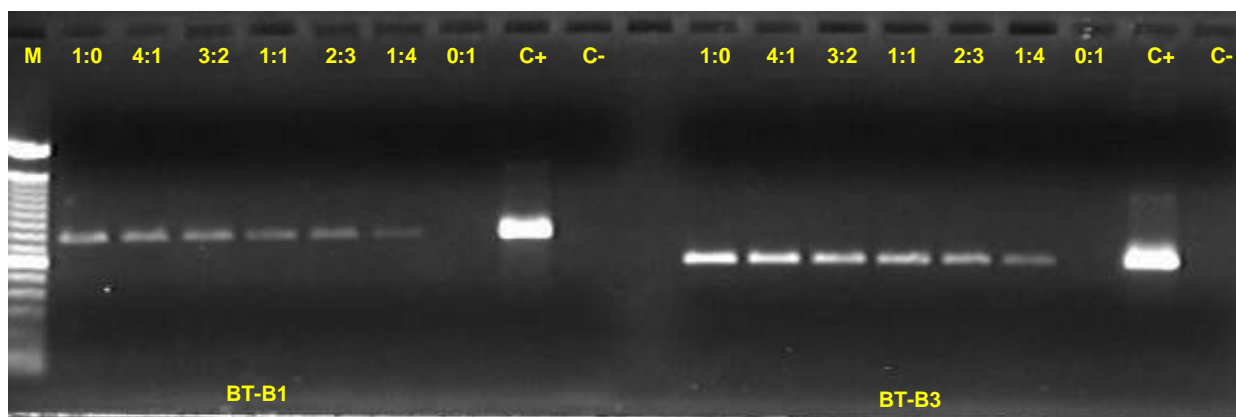


Figura 2 – Teste de determinação das quantidades máximas de contaminação em uma amostra de DNA do biótipo B de *B. tabaci* ainda viável para a identificação molecular com os *primers* de SCAR BT-B1 e BT-B3. Os números indicam as proporções de DNA de *B. tabaci* em relação a *A. gemmatalis*. O código C+ corresponde aos fragmentos de RAPD clonados nos plasmídios pBEM-B1 e pBEM-B7, respectivamente; 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 3).

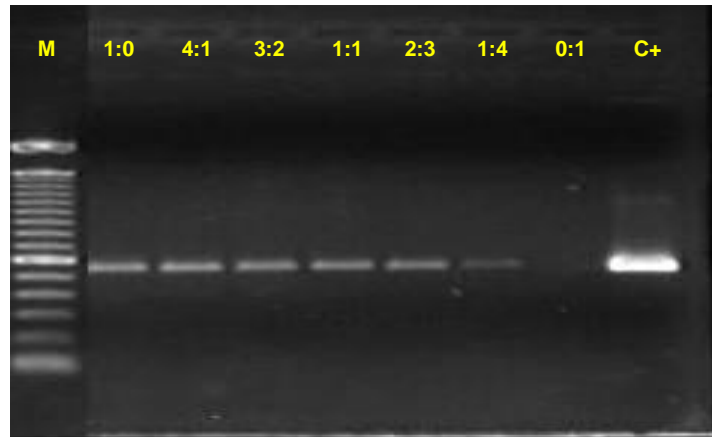


Figura 3 – Teste de determinação das quantidades máximas de contaminação em uma amostra de DNA do biótipo BR de *B. tabaci* ainda viável para a identificação molecular com o *primer* de SCAR BT-BR1. Os números indicam as proporções de DNA de *B. tabaci* em relação a *A. gemmatalis*. O código C+ corresponde ao fragmento de RAPD clonado no plasmídeo pBEM-BR2; 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 4).

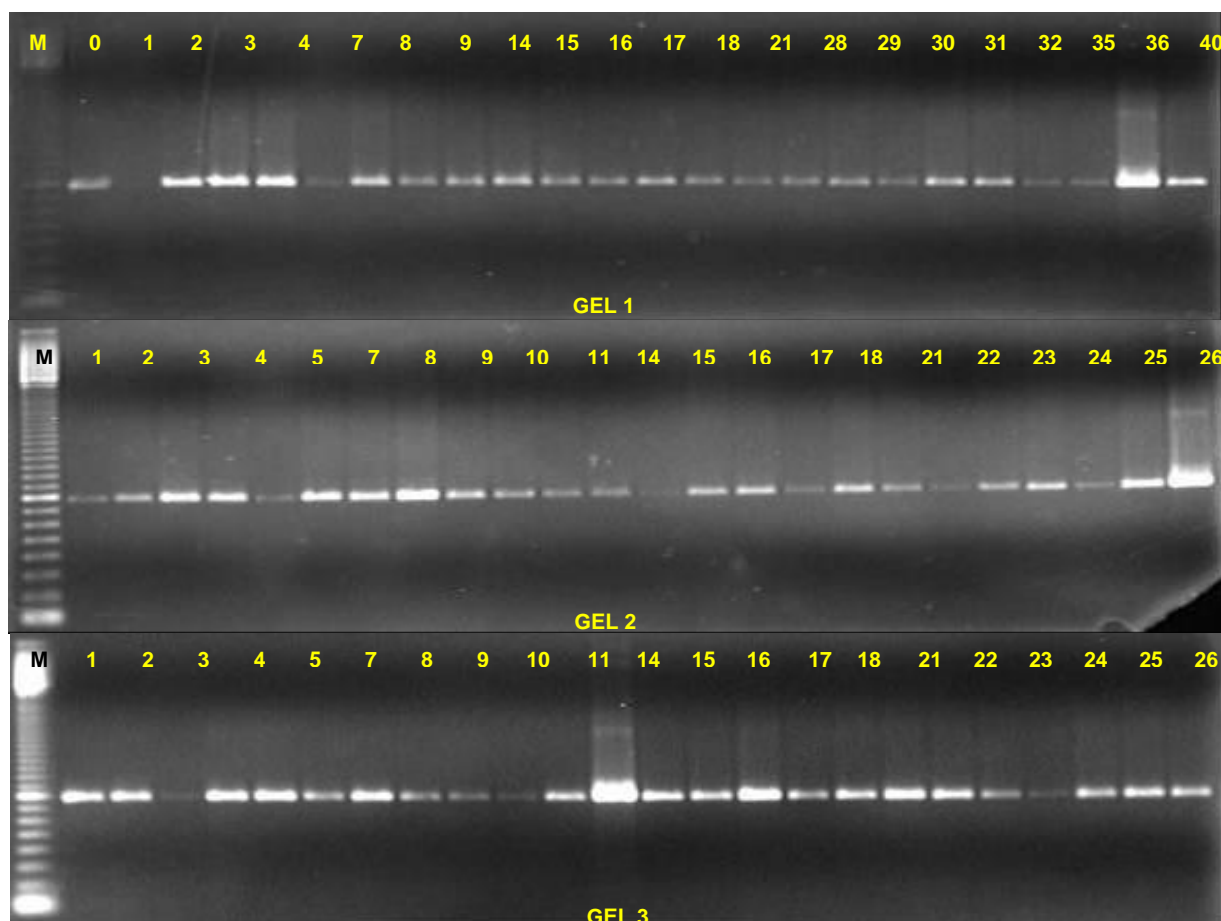


Figura 4 – Detecção do biótipo B de *B. tabaci* sob diferentes condições de monitoramento utilizando-se o *kít* BT-B1. Gel 1 - monitoramento sem fixação em etanol a 25 °C; Gel 2 - monitoramento com fixação em etanol a 25 °C; Gel 3 - monitoramento sem fixação a 45 °C. Os números indicam os dias de monitoramento; O código C+ corresponde ao fragmento de RAPD clonado no plasmídeo pBEM-B1; a letra B indica o controle para o biótipo B de *B. tabaci*; 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 os *kits* diagnósticos. Primeiramente realizou-se a identificação molecular com o *kit* diagnóstico BT-B1 (Figura 5).

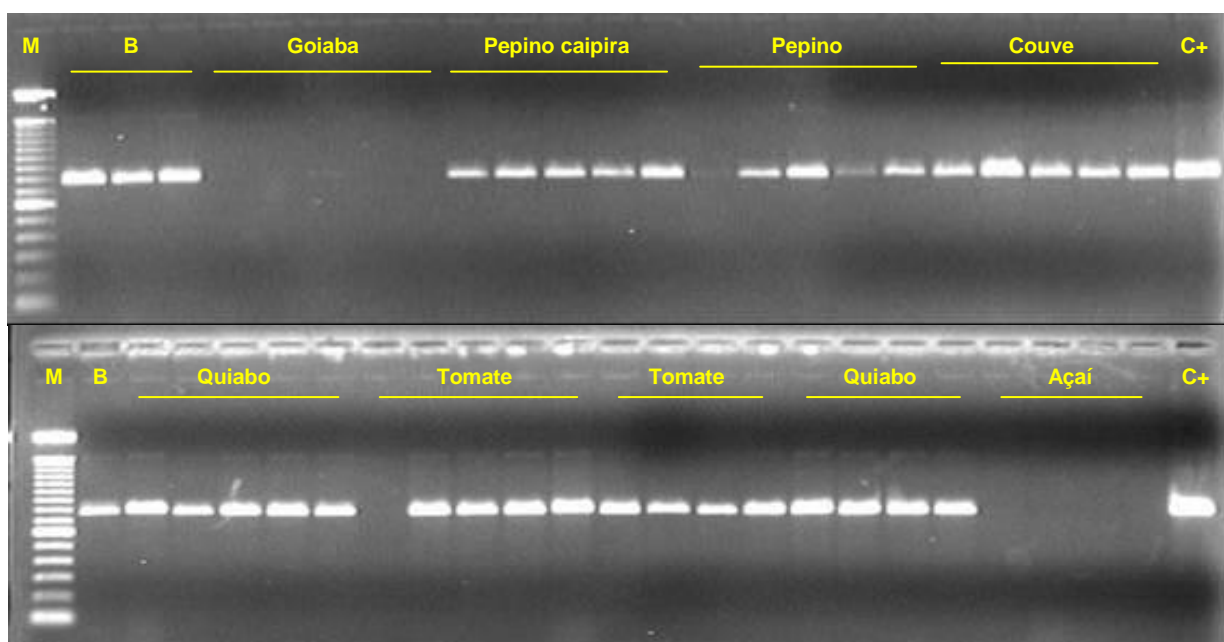


Figura 5 – Identificação do biótipo B de *B. tabaci* em rotina de laboratório empregando-se o *kit* diagnóstico BT-B1 a partir de amostras coletadas em localidades do estado do Maranhão. O código C+ corresponde ao fragmento de RAPD clonado no plasmídio pBEM-B1; A letra B indica o controle para o biótipo B de *B. tabaci*; 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 açai) 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 açai (Figura 6).

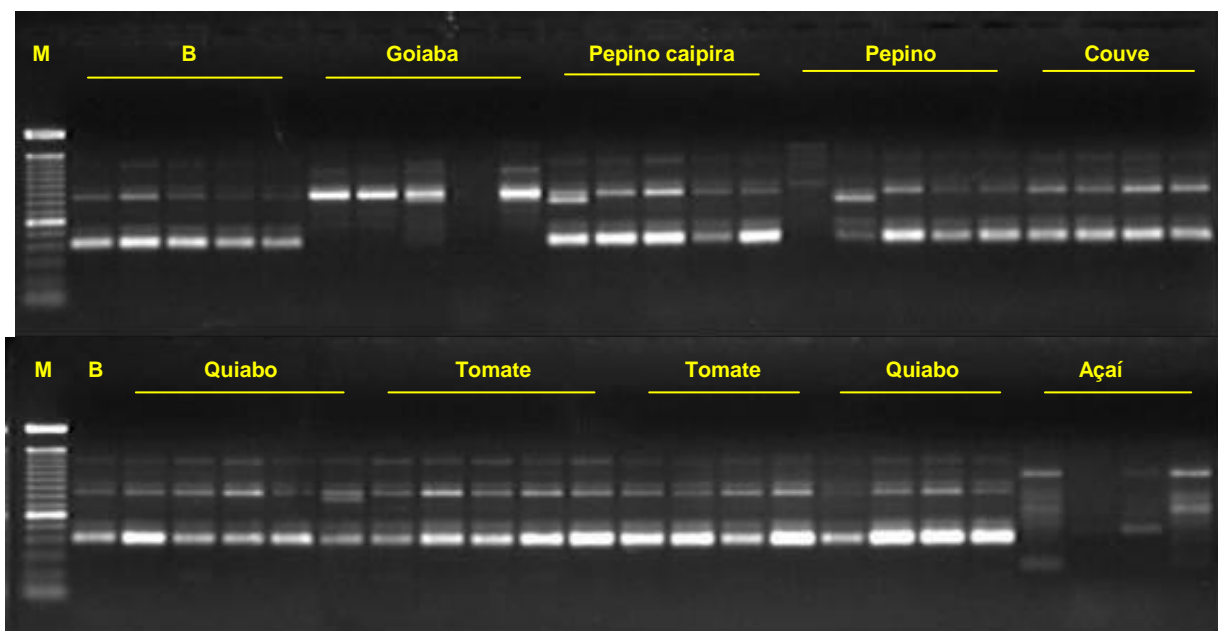


Figura 6 – Perfil de marcadores RAPD obtidos com o *primer* OPA-10 a partir de amostras coletadas em localidades do Maranhão. A letra B corresponde ao controle para o biótipo B de *B. tabaci* e a A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder. A seta indica o fragmento de RAPD que originou 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 coletada em goiaba produziu esse fragmento de 800 pb, provavelmente, não existe o sítio de anelamento para os *primers* de SCAR nessa amostra. Para a população coletada em açai 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 7).

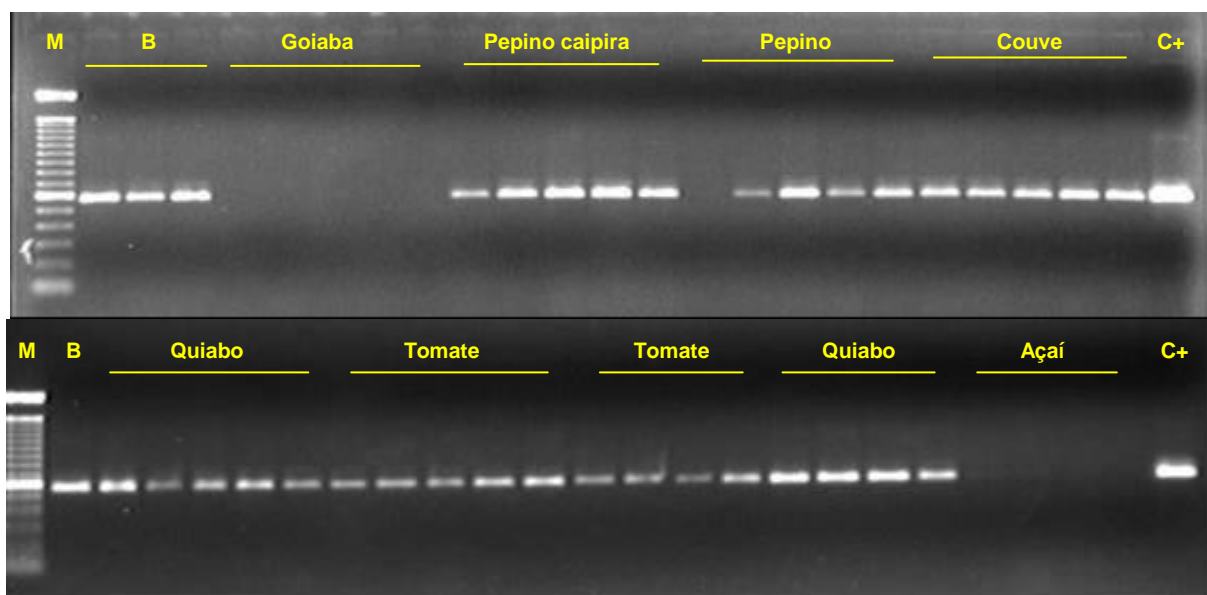


Figura 7 – Identificação do biótipo B de *B. tabaci* em rotina de laboratório empregando-se o *kit* diagnóstico BT-B3 a partir de amostras coletadas em localidades do estado do Maranhão. O código C+ corresponde ao fragmento de RAPD clonado no plasmídio pBEM-B7; A letra B indica o controle para o biótipo B de *B. tabaci*; A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder.

Das nove populações submetidas à 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 600pb. Empregando-se esse *primer*, foram observadas diferenças entre os perfis eletroforéticos produzidos pelas diversas amostras estudadas (Figura 8).

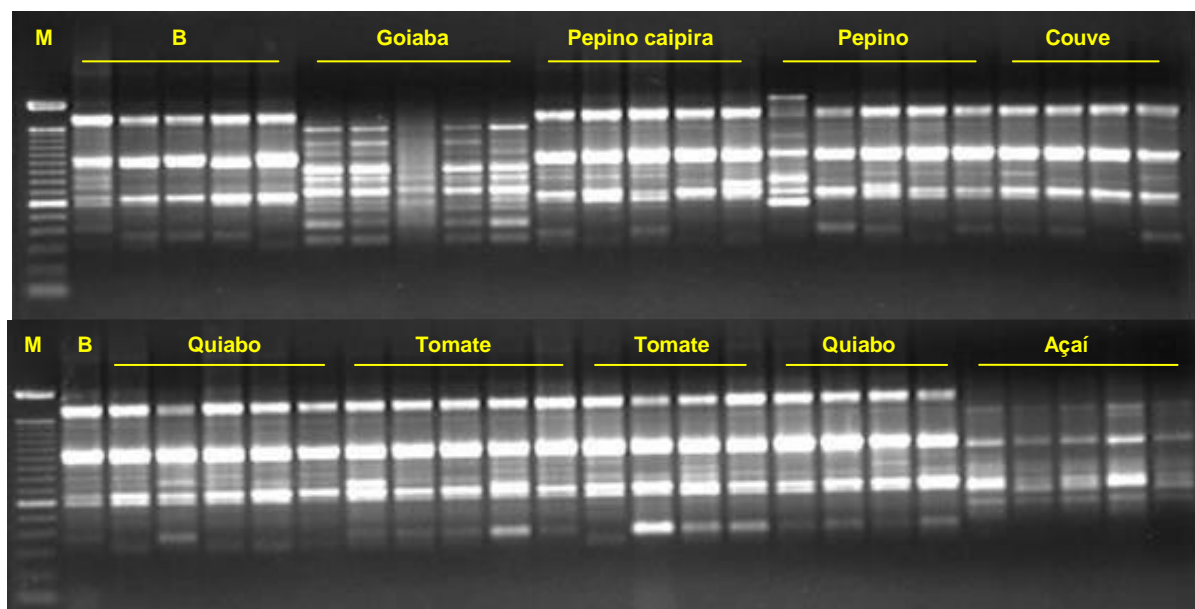


Figura 8 – Perfil de marcadores RAPD obtidos com o *primer* OPA-13 a partir de amostras coletadas em localidades do Maranhão. A letra B corresponde ao controle para o biótipo B e a letra M indica o marcador de massa molecular 100pb ladder. A seta indica o fragmento de RAPD que originou o marcador BT-B3.

As reações de RAPD com o *primer* OPA-13 produziram o fragmento de 600pb 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 600pb. Contudo, a amostra coletada em açaí produziu um forte sinal de amplificação na região aproximada de 600pb. O elemento diferenciador dessa população em relação ao biótipo B foi a ausência de um fragmento de massa molecular de 1500pb 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 produzir um fragmento de 600pb, provavelmente, não existe o sítio de anelamento para os *primers* de SCAR nessa população.

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 2400pb 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 de o 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. 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 à 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, é possível, 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.

Conclusões

A sensibilidade dos marcadores SCAR associada a sua precisão 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, havendo sinal de amplificação mesmo que haja a contaminação com DNA originário de outras espécies de insetos. Além disso, houve sinal de amplificação quando foram analisados apenas vestígios do inseto de interesse. Ao mesmo tempo, quando insetos adultos de *B. tabaci* biótipo B foram monitorados sob diferentes condições, um sinal de amplificação foi obtido em ambos os conjuntos de *primers* testados. Dessa forma, foi possível o estabelecimento de testes de identificação de biótipos de *B. tabaci* por meio da técnica de SCAR.

Os marcadores SCAR desenvolvidos permitiram identificar o biótipo B de *B. tabaci* mesmo que ainda não se conheça todas as características biológicas e comportamentais desse inseto, permitindo identificar com segurança, populações de um mesmo biótipo da praga quarentenária.

Bibliografia

- ABE, H., HARADA, T., KANEBARA, M., SHIMADA, T., OHBAYASHI, F. & OSHIKI, T. Genetic mapping of RAPD markers linked to the denonucleosis refractoness gene, *nsd-1*, in the silkworn, *Bombyx mori*. *Genes Genetics System* 73:237-242. 1998.
- AGUSTI, N., DE VICENTE, M.C. & GABARRA, R. 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. 1999.
- AGUSTI, N., DE VICENTE, M.C. & GABARRA, R. DEVELOPING SCAR markers to study predation on *Trialeurodis vaporariorum*. *Insect Molecular Biology* 9(3):263-268. 2000.
- BEHURA, S.K., SAHU, S.C., RAJAMANI, S., DEVI, A., MAGO, R. NAIR, S. & 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. & DOS SANTOS, F.R. Marcadores moleculares. In: *Biotecnologia simplificada*. Editora Suprema: Viçosa-MG. 249 p. 2002.
- KETHIDI, D.R., RODEN, D.B., LADD, T.R., KRELL, P.J., RETNAKARAN, A. & FENG, Q. 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. 2003.
- MANGUIN, S., KENGNE, P., SONNIER, L., HARBACH, R. E., BAIMAI, V. TRUNG, H. D. & COOSEMANS, M. 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. 2002.
- MILACH, S.C.K. Marcadores de DNA. Aplicações no melhoramento de plantas. <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio05/marcadoresdna.pdf> acesso em 23/12/2005. 2005.
- MONNERAT, R.G., LEAL-BERTIOLI, S., BERTIOLI, D., BUTT, T. & BORDAT, D. Variabilidade Genética do Parasitóide *Diadegma* sp. através de RAPD-PCR. *Horticultura Brasileira* 22(1):90-92. 2004.

PARAN, I. & MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical Applied Genetics* 85:985-993. 1993.

QUEIROZ, P.R., MARTINS, E.S., MONNERATT, R.G. & LIMA, L.H.C. 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. 2004.

ROMANOWSKI, G., LORENZ, M.G. & WACKERNAGEL, W. Use of polymerase chain reaction and electroporation of *Escherichia coli* to monitor the persistence of extracellular plasmid DNA introduced into natural soils. *Applied Environmental Microbiology* 59(10):3438-3446. 1993.

SIMON, J.C., LETREME, N. & LATORRE, A. 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. 1999.

TSAI, Y. -L. E OLSON, B. H. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Applied Environmental Microbiology* 58:754-757. 1992a.

TSAI, Y. -L. E OLSON, B. H. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments by polymerase chain reaction. *Applied Environmental Microbiology* 58:2292-2295. 1992b.