

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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 175

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

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

D 451 Desenvolvimento de marcadores SCAR para a identificação de biótipos de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) / Paulo Roberto Queiroz ... [et al.]. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
30 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 175).

1. *Bemisia tabaci* - marcadores SCAR - identificação de biótipos. 2. *Arachis* - nematóides - *Meloidogyne* spp. - resistência. I. Queiroz, Paulo Roberto. II. Série.
632.6257 - CDD 21.

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

Paulo Roberto Queiroz¹

Maria de Nazaré Klautau Guimarães²

Dulce Maria Sucena da Rocha³

Maria Regina Vilarinho de Oliveira⁴

Luzia Helena Corrêa Lima⁵

Resumo

Visando à elucidação dos mecanismos de resistência em *Arachis* silvestre a nematóides do gênero *Meloidogyne* spp., foram realizados experimentos de análise da expressão diferencial de seqüências potencialmente associadas a estes mecanismos através de Northern-blot. Estudos anteriores demonstraram que *Arachis stenosperma* possui um mecanismo de resistência similar à reação de hipersensibilidade na região onde se encontra o nematóide e no estágio de estabelecimento do sítio de alimentação. Duas seqüências diferencialmente expressas em raízes inoculadas com *Meloidogyne arenaria* (ARP- Auxin repressed Protein e CKX- catalase oxidase) foram analisadas quanto a sua distribuição temporal visando à sua associação com o processo de resistência nesta planta. Ambas estão associadas ao balanço hormonal da planta (auxina e citocinina). ARP foi induzida nas raízes inoculadas em comparação com as controle (não inoculadas), demonstrando a inibição ou degradação de auxina naquele ponto. No caso da CKX, nas raízes inoculadas de *A. stenosperma* o gene CKX foi induzido, indicando indiretamente a presença de citocinina e consequentemente sua degradação. A indução da degradação destes hormônios ocorreu justamente em pontos que, segundo estudo histopatológico realizado previamente, os juvenis de 2º estágio (J2) estariam penetrando nas raízes desta espécie e tentando estabelecer o seu sítio de alimentação.

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

Abstract

The molecular markers allow differentiating two or more individuals starting from the analysis of areas of DNA through very established molecular techniques. The RAPD markers are of easy manipulation and of smaller cost, although they are of less solid results. In that way, the conversion of the RAPD markers in SCAR allows the development of more specific markers, supplying molecular tools inside for the biotypes differentiation of a species, such as, the whitefly *Bemisia tabaci*. The SCAR markers are based on the sequencing of polymorphic fragments generated by RAPD and of the drawing of specific primers superior to 10-mer. Once available, the technique is very similar to the one of RAPD, what represents a similar cost; however it is more advantageous and less sensitive to the changes in the amplification conditions, being obtained larger reproduction and larger consistence. In function of their differentiated biological characteristics, each biotype of *B. tabaci* represents risks to several commercial crops and the development of kits diagnoses, based in DNA, and is an advantageous to the control of the entrance of those biotypes in agricultural areas, minimizing the damages caused by that insect.

Key word: *Bemisia tabaci*; RAPD; SCAR

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 disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar a variação no DNA e, assim, 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; 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 e LUTY, 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 (BORÉM e SANTOS, 2002; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

O passo inicial consiste em fazer uma comparação entre os tipos de marcadores a serem utilizados em programas de identificação de espécies. Como exemplo, marcadores de RFLP que têm sido utilizados em estudos de mapeamento comparativo em função da consistência dos resultados obtidos, 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) 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 (BORÉM e SANTOS, 2002).

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 sequência 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 sequência 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 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 (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 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 a mudanças nas

condições de amplificação e representar marcadores codominantes e assim, de maior reprodução (KETHIDI et al., 2003; SHENG et al., 2006; ZHANG et al., 2007).

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. Dessa forma, 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 (BORÉM e SANTOS, 2002).

Material e Métodos

Manutenção das amostras de populações de *B. tabaci*

Fêmeas adultas provenientes de duas populações de *B. tabaci* (Tabela 1) foram identificadas segundo critérios morfológicos e em seguida, mantidas em álcool 70% a – 20°C.

Tabela 1 – 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 cinco fêmeas adultas e individualizadas de *B. tabaci* em 60 µL 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 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 instar de lepidópteros (*Anticarsia gemmatalis*, *Spodoptera frugiperda*;) e larvas de coleópteros (*Anthonomous grandis*) foi extraído 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).

Obtenção de DNA de mosca negra *Aleurocanthus woglumi*

Fêmeas individualizadas de *A. woglumi* foram maceradas e o seu DNA extraído em 100µL de tampão de extração (Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1mM, Triton X-100 0,3% e proteinase K 60µg.mL⁻¹). A seguir, completou-se o volume com 200µL 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 10s. 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 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 de um *primer* de seqüência aleatória (Operon Technologies, Inc.) na concentração de 10µM (Tabela 2), 0,6µL de dNTP 10mM, 0,3µL de *Taq* DNA polimerase (Amersham, CA, USA) e 4µL de DNA (20 ng).

Tabela 2 – *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 90mM e EDTA 1mM) durante 2h a 100V. 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. A seguir, os fragmentos de interesse foram excisados do gel sob luz ultravioleta e purificados usando-se o *kit* Concert™ rapid gel extraction system (Gibco BRL) seguindo-se as recomendações do fabricante.

Ligação dos fragmentos de RAPD em plasmídeo

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®-T vector system (Promega) segundo as recomendações do fabricante por 16h a 4°C.

Cultura bacteriana para clonagem

A colônia bacteriana *Escherichia coli* DH5α foi mantida em meio LB líquido (caseína 10g.L^{-1} ; NaCl 5g.L^{-1} ; extrato de levedura 5g.L^{-1} pH 7,0) acrescido de glicerol na concentração de 50% e mantida a – 20°C.

Transformação bacteriana

Um volume de 150μL da linhagem DH5α de *E coli* mantida em glicerol foi inoculado em 5mL de meio LB e mantido por 16h a 37°C e 150 rpm. Em seguida, 150μL da cultura foram inoculados em 5mL de meio LB e mantidos a 37°C e 150 rpm por 3h.

Posteriormente, 1,5mL de meio foram transferidos para tubo estéril, centrifugados a 12000xg por 20s a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 500μL de CaCl_2 50mM e mantidas por 10min a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas a 12000xg por 20s com 300 μL de CaCl_2 50mM e mantidas no gelo por 20 min. Alíquotas de 50μL foram colocadas em tubos estéreis com 3μL 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 1mL de meio LB

líquido por 1h a 37°C e 150 rpm. Ao final do período de recuperação, as culturas foram centrifugadas a 12000xg por 1 min, ressuspensas em 100µL de meio LB, sendo as células transformadas selecionadas em LB sólido suplementado com ampicilina 100µg.mL⁻¹, IPTG 0,5mM e X-Gal 80µg.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 100µg.mL⁻¹, IPTG 0,5mM e X-Gal 80µg.mL⁻¹ a 37°C para confirmação da ligação.

Extração de plasmídios

Inoculou-se 150µL de células transformadas de *E. coli* em 5mL de LB suplementado com ampicilina 100µg.mL⁻¹, mantendo-se a 37°C por 16h com agitação de 150 rpm. Após a fase de crescimento, os plasmídios foram extraídos utilizando-se o *kit* ConcertTM 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 30µL de reação continha 0,5µL *SacI* (10 U.µL⁻¹), 0,5µL *SacII* (10 U.µL⁻¹), 3,0µL tampão OPA 10 X (One-Phor-All buffer *PLUS*) (Amersham Biotech), 3,0µL de plasmídio e 23,0µL de água milliQ. Os sistemas de digestão foram incubados a 37°C por 16h sendo, posteriormente, aplicados em gel de agarose 0,8% submerso em tampão TBE 1X durante 2h a 100V. A documentação fotográfica foi feita usando-se o sistema EagleEye II still video systemTM (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, 100ng.µL⁻¹ dos vetores de clonagem foram seqüenciados usando-se o *kit* ABI PRISM[®] BigDyeTM 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 nucleotídeos 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 25nmol, 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 vários biótipos de *Bemisia tabaci* (Tabela 3).

Tabela 3 – 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>A. cocois</i>
226	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF / Algodão	<i>B. tabaci</i> biótipo BR
228	Feira de Santana – BA / Mandioca	<i>A. aepim</i>
236	Deadópolis – MS / Mandioca	<i>B. tuberculata</i>
278	Division of Plant Industry – Flórida / <i>Citrus</i>	<i>A. woglumi</i>
281	Águas Mornas – SC / Abobrinha e Pepino	<i>T. 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>A. aegypti</i>
Ag	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF / Laboratório de Criação de Insetos	<i>A. gemmatalis</i>
Ant	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF / Laboratório de Criação de Insetos	<i>A. grandis</i>
Sf	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF / Laboratório de Criação de Insetos	<i>S. frugiperda</i>
Px	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF / Laboratório de Criação de Insetos	<i>P. 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.

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 (100 mM Tris-HCl pH 9,2, 500 mM KCl e 1% Tween 20), 1,5µL MgCl₂ 25mM, 1,5µL de cada *primer* (IDT, Inc., Coralville, IA) na concentração de 3µM, 1,2µL DMSO, 0,3µL dNTP 10mM, 0,4 µL *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 plasmídeo 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 (100 mM Tris-HCl pH 9,2, 500mM KCl e 1% Tween 20), 1,5µL MgCl₂ 25mM, 1,5µL de cada *primer* (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 5µL de água milliQ autoclavada e, como controle positivo, 5µL (4ng.µL⁻¹) do plasmídeo 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 25µL de uma mistura contendo 11,8µL 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, 0,5µL DMSO, 1,5µL de cada *primer* (IDT, Inc., Coralville, IA) na concentração de 1,0µM, 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 plasmídeo pBEM-BR2 contendo a sequência 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 3 min 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 1min 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.

Visualização dos fragmentos de DNA por eletroforese

Os produtos de amplificação originários de RAPD ou SCAR foram visualizados 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 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 1).

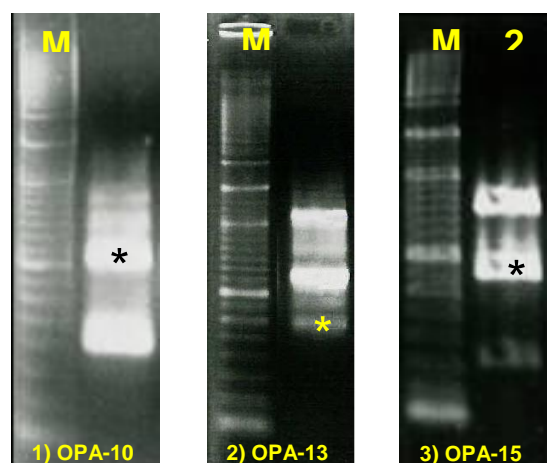


Figura 1 – Fragmentos de RAPD produzidos a partir do DNA extraído dos biótipos de *B. tabaci*. O asterisco indica os fragmentos selecionados para o desenho dos *primers* de SCAR. Gel 1 = biótipo B amplificado com o *primer* OPA-10; Gel 2 = biótipo B amplificado com o *primer* OPA-13; Gel 3 = biótipo 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 plasmídio pGEM-T para a clonagem molecular. A figura 2 mostra o gel de agarose com os fragmentos de 831 pb, 582 pb e 794 pb, digeridos com as enzimas *SacI* e *SacII*, confirmando a clonagem.

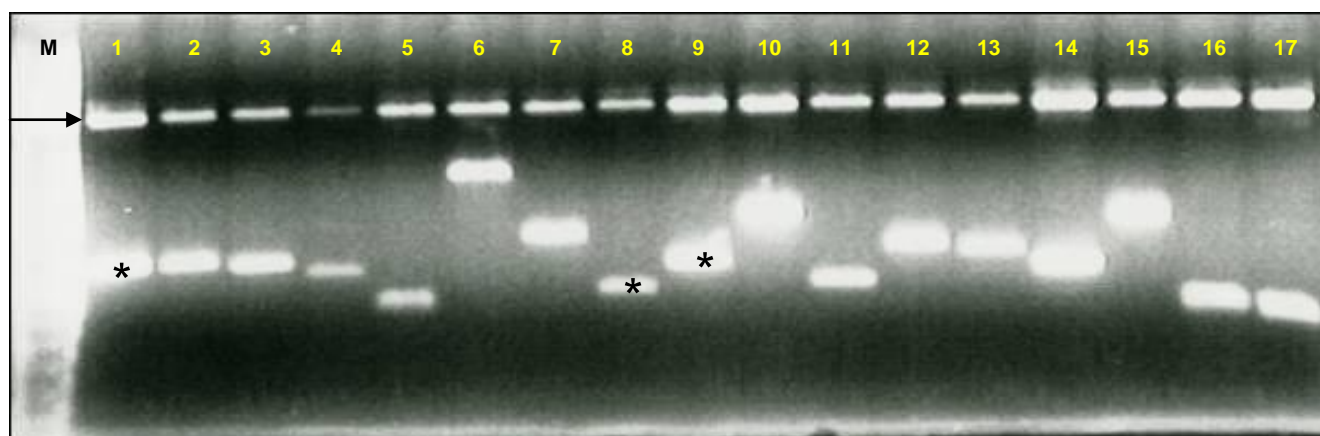


Figura 2 – Digestões de plasmídios resultantes da clonagem de vários fragmentos de RAPD a partir dos biótipos B e BR de *B. tabaci*. Os asteriscos indicam os insertos clonados no vetor pGEM-T, assim como, a seta indica o vetor de clonagem. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder.

Uma vez confirmada a inserção das bandas de RAPD nos seus respectivos vetores de clonagem, os fragmentos de interesse foram seqüenciados e a composição de nucleotídios 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 3).

GTGATCGCAGAAATGTCTCACTGCACGCCTGGATATTTACCCCAAGCGCACAAGCACGATA
AATTGCGGTTGCAGTTTTTTGAAGGCGCTTTTGATACTTACAATTTACCTGAGGCCGGTGCC
GAGATGGCCAGATTGAACGAAGTAGGAAACATAGGTGGGAAGTGTCGTATTCAATCAAGT
GCCTAGACCTTTTTTTATGACCCCTCCCAAATCTATTCTTTTCATTAGAGGAAATTGTATCTAT
TTCAATTTTGATGATTACAATAAACTTGACAAAAAAAAAAAAAAAAACAATGATCCCTCCTA
CCGCAAACTGTTAGCGGGCTGATAAACCTACATTTTCATTTCTCCTCTCTGATATCTCTGTA
TCCTGATCGCCTTTTTGGAGGCCCTTATTTGCATGTGATTCTCCTCAAAGTCTCTGTTTCTTA
CATAGTGTTTAATCCCTTGCAATCATCACAGGGCATTTCATTTCAAGAGACCCTAATCAGC
ATCTTGCCCTCATTTTTTCATTTTGATTACCTGACGATATAGCATTAAAATTACGCAATATCCTA
CATAACATCTGTTAAAAATAAAAAAAAAATAAAAAAAAAACATACGGCCACATGAGCATAAT
CGAAGAAGGGAAACATGCTCGTTGATGACGGCGCAGAGATACAACCTATTCGTGTTTGATG
GATGTCCGTGTTGCATTTGCAAAATTGAAGGCGCGATGGTGCGAGGCGTGATCTCGCAAT
GCTTCGTTCTAAGCAGTCTATTCTGTCAACAAGGTGCCGCTCAGATTTTGGAGAAAAGTTAA
AAAACGAGTCCCGCATACTTCTCTCCTATTTTCGG**CTGCGATCAC**

Figura 3 – 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 peptídio depositado no GenBank. Foi possível também determinar o perfil de sítios de restrição que estão distribuídos ao longo dessa seqüência (Figura 4).


```

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 AATTGCGGTTGCAGTTTTTGAAGGCGCTTTTGATACTTACAATTTACCTGAGGCCGGTGC
41 R D G Q I E R S R K H R W E V S Y S I K
121 CGAGATGGCCAGATTGAACGAAGTAGGAAACATAGGTGGGAAGTGTCGTATTCAATCAAG
61 C L D L F L * P L P N L F F H * R K L Y
181 TGCCTAGACCTTTTTTATGACCCCTCCCAAATCTATTCTTTCATTAGAGGAAATTGTAT
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 qat|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 ATCTCTGTATCCTGATCGCCTTTTTGGAGGCCCTTATTTGCATGTGATTCTCAAAAGTC
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 GACCCTAATCAGCATCTTGCCTCATTTCATTTGATTACCTGACGATATAGCATTTAAA
181 I T Q Y P T Y H L L K I K K I K * K K H
541 ATTACGCAATATCCTACATACCATCTGTAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAAACAT
601 TaqI t|cga620 MboII gaagannnnnnnn|634
201 T A T * A * S K K G N M L V D D G A E I
601 ACGGCCACATGAGCATAATCGAAGAAGGGAACATGCTCGTTGATGACGGCGCAGAGATA
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 4 – Perfil de sítios de restrição distribuídos ao longo da sequência 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 sequência 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 peptídeo semelhante no GenBank.

CAGCACCCACGGACATTGAAATTGATCTTGACTAGATGTCAAATCGACGGTTAGGCCTACT
TTATTTTTACGATATTCTTCCCTTTTTTTCGTTTGCGACGTTTCAAATACTAATCATAAGCCT
CTTTTAAATTTATTGGATGTAACATTTTTTAAAAATAAACCCACCGGCTTCGAACGCTGTTT
AGACACAAAAATTCAAACCTTCCAACAAGCAACACAAACGAGACCTAAAAGATATTGAACTG
TGATAATAATTTCTAAGAACTCTGTAGCGAAGAGTAGGCACTGATTCTTTCGTGAACTTT
TTTTCTTAAAGAGCGATGCCATTTATTAAGGTCAGAATCGTCAATCCTTCGTGCGATTGTACC
AAAACGATTTAAACCCGCCAAACACATGGGGTTTAGTCTATGATGGTAGAGTTCACGAGAT
AATGGCAATTTAAACTCATTGTTTTTAAGGTCATGAAAGAACTACCAGTCCAGAAGGGTCAT
GAAAGCGAAATAAGGGAAGAAAAGCTGTCAAAGAAGACGCTTGATTTCGTTTCCTCCCGAGA
GACGAAGGATACAG**TGGGTGCTG**

Figura 5 – Composição de nucleotídeos 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 sequência (Figura 6).

```

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|nnnnnnntcttc70
21 F I F T I F F P F F R L R R F K I L I I
61 TTTATTTTTACGATATTCTTCCCTTTTTTTCGTTTGCGACGTTTCAAATACTAATCATA
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 CGCTGTTTAGACACAAAAATTCAAACCTCCAACAAGCAACACAAACGAGACCTAAAAGA
241                               HinfI g|antc296
241                               SspI aat|att261                               MboII gaagannnnnnnn|294
81 Y * T V I I I F L R T L * R R V G T D S
241 TATTGAACTGTGATAATAATTTCTAAGAACTCTGTAGCGAAGAGTAGGCACTGATTCT
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 TTCGTGAACTTTTTTCTTAAAGAGCGATGCCATTTATTAAGGTCAGAATCGTCAATCCT
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 TAGAGTTCACGAGATAATGGCAATTAAACTCATTGTTTTTAAGGTCATGAAAGAACTAC
481                               MboII gaagannnnnnnn|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 gaagannnnnnnn|543
541 HinfI g|antc541
181 I R F L P R D E G Y S G C *
541 ATTCGTTTCCTCCCGAGAGACGAAGGATACAGTGGGTGCTGA

```

Figura 6 – Perfil de sítios de restrição distribuídos ao longo da sequência de 582pb 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 *Sspl*.

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 831pb gerado por RAPD (Figura 7).

TTCCGAACCCGCAAGATAGTGATTTTCCACGCCGAGATTCGTAGTAATAGTNTCCACATGT
GATCCTCCCCGTGCAGTGCTGTGATTTTTTTTAGTACCCTTGTTTTTCGGAGTCGTATGACT
TCCTTGTTGCTAGTTGTTTAAGAAAATAGTCAAGCTGTGGGGCTCAGGGGCTTTCTTCCTTC
CCCCGCAAGGGATGTACTACCCGGTAAGATGTTTTGACACTCCATCCATTTTGTCTCTCT
CGTGAATCGAATCTCACGCAAGGCGTGTTCCGCGAATTCTGAAGCGCGTCTCGGCCAGAG
AGAGGCCCTCGTTCCGTTGCGCAATTTATGCTGAACTCCTCGATTTCTGACAGATTTCGC
TTCCGAGTTTCGCAACATGCAGGACAACTTGTTGGATTCTGTCTGGCCACACAGTCCTAT
CATATTGCTCAATATTGGGCGCCCTCTGTTTACTAATGTAATAACGGAGGGTCCCTCCAGC
TTTTGTTTCTCAACTGAAATCCGAGCTAAATCTTGGCTTTTGTTCAGTCGTTATTAATCTAGA
TCTTGGGCACACTGGTCTTAATGTTTCTTTCTTATCAGTTGTTATCCATATTCATGGACATTT
CTTTTCGAGCGTAGGGTTACACTGTATGTTTACGTTCAACTACCGAAGTAGATTATGTAGTA
GGCTCCTTTGTCAGCACAGCAGAATGCATTACAGAACCAAATTATTCCACCTATTCGTTAC
TTTAAATGTACGGCTTAAATCTCAAGTTTAATCCTCCACCAAAGGGTTCCGAA

Figura 7 – Composição de nucleotídeos do fragmento de 793pb 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 sequência semelhante no GenBank.

A sequência 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), *Sspl* (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 8).

```

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 TTCCGAACCCGCAAGATAGTGATTTTCCACGCCGAGATTCGTAGTAATAGTNTCCACATG
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 TGATCCTCCCCGTGCAGTGCTGTGATTTTTTTTAGTACCCTTGTTTTTCGGAGTCGTATG
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 ACTTCCTTGTTGCTAGTTGTTTAAAGAAAATAGTCAAGCTGTGGGGCTCAGGGGCTTTCTT
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 CCTTCCCCCGCAAGGATGTACTACCCGGTAAGATGTTTTGACACTCCATCCATTTTGT
241                                HinfI g|antc257
241                                TaqI t|cga255
241                                HinfI g|antc252
241                                EcoRI g|aatc282
81 F L S * I E S H A R R V P R I L K R V S
241 TTTCTCTCGTGAATCGAATCTCACGCAAGGCGTGTTCCGCGAATTCTGAAGCGCGTCTCG
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 AGATTCGCTTCCGAGTTTCGCAACATGCAGGACAACTTGTTGGATTCTGTCTGGCCACA
421                                NarI gg|cgcc449
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 CAGTCCTATCATATTGCTCAATATTGGGCGCCCTCTGTTTACTAATGTAATAACGGAGGG
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 TCCCTCCAGCTTTTGTCTCAACTGAAATCCGAGCTAAATCTTGGCTTTTGTTCAGTCG
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 GAAGTAGATTATGTAGTAGGCTCCTTTGTCTAGCAGCAGCAGAATGCATTACAGAACCAAAA
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 TTATTCCACCTATTCGTTACTTTAAATGTACGGCTTAAATCTCAAGTTTAAATCCTCCACC
261 K G F G
781 AAAGGGTTCGGA

```

Figura 8 – Perfil de sítios de restrição distribuídos ao longo da sequência 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*.

Os 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, DNAm (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 Malgorn e Coquoz (1999) para a identificação de califórídeos 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 *Ddel*. Os perfis de digestão em gel de agarose permitiram diferenciar as espécies de califórídeos: *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 4).

Tabela 4 – Seqüência de *primers* para reações de PCR específicas para os biótipos de *B. tabaci*.

Primer	Seqüência 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 se testou 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 *A. gemmatalis* para a verificação da especificidade do *primer* (Figura 9).

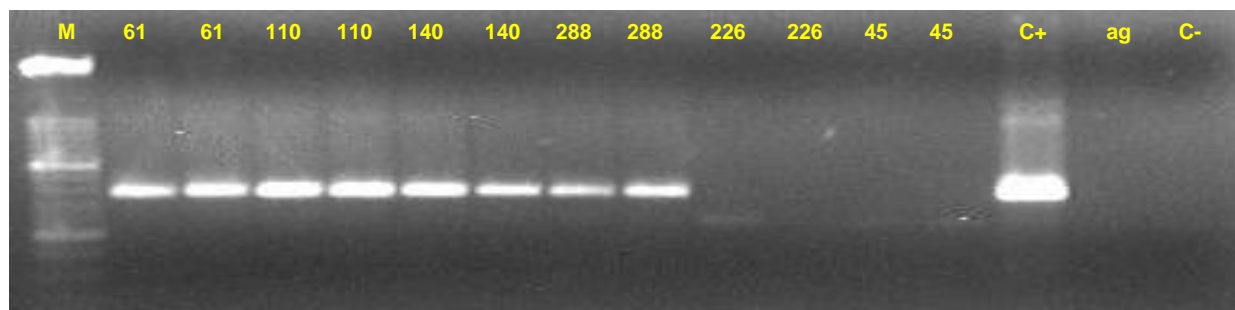


Figura 9 – Reações de SCAR utilizando-se o *primer* BT-B1 para a detecção do biótipo B de *B. tabaci*. Os códigos 61, 110, 140 e 288 correspondem às amostras da coleção biológica de referência de insetos identificados como *B. tabaci* biótipo B; as amostras 226 e 45 são amostras dessa mesma coleção identificadas como sendo o biótipo BR. O código C+ corresponde ao fragmento de RAPD clonado no plasmídio pBEM-B1; 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 sequência de DNA em outros grupos de insetos (Figura 10).

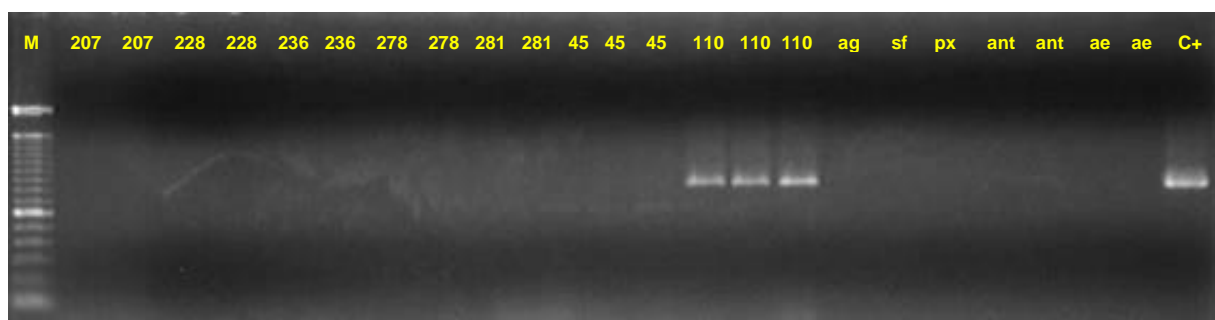


Figura 10 – Reações de SCAR utilizando-se o *primer* BT-B1 para a detecção do biótipo B de *B. tabaci* entre várias amostras de insetos de diferentes famílias ou gêneros. Os códigos indicam: 207, *A. cocois*; 228, *A. aepim*; 236, *B. tuberculata*; 278, *A. woglumi*; 281, *T. vaporariorum*; 45, *B. tabaci* 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 plasmídio pBEM-B1. 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 11).

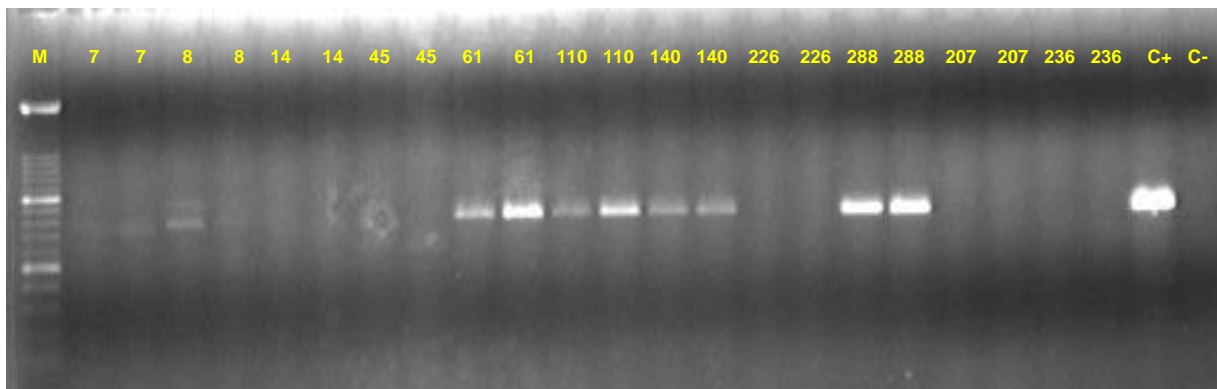


Figura 11 – Uso do *primer* BT-B1 para a detecção do biótipo B quando comparado com outros biótipos de *B. tabaci*. Os números 7 e 14 indicam o biótipo Q; 8, biótipo cassava; 45 e 226 representam o biótipo BR; 61, 110, 140 e 288 são o biótipo B. Os controles usados foram: 207, *A. aepim* e 236, *B. tuberculata*. O código C+ corresponde ao fragmento de RAPD clonado no plasmídio pBEM-B1; 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 12).

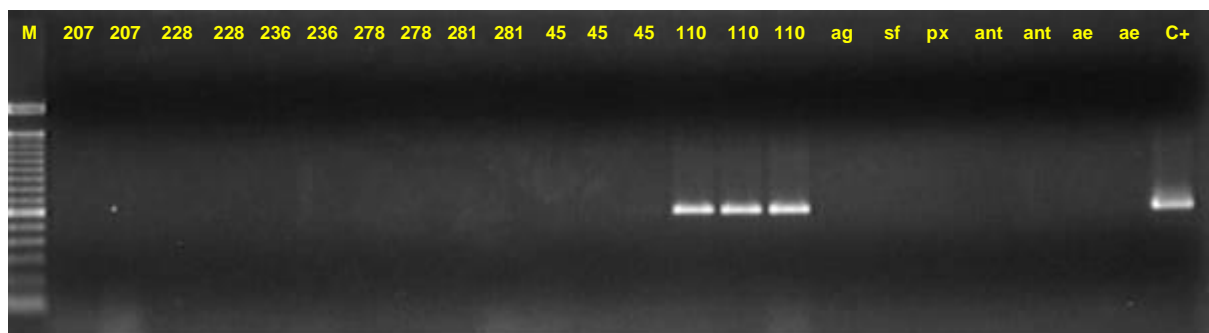


Figura 12 – Reações de SCAR com o *primer* BT-B3. Os números indicam: 207, *A. cocois*; 228, *A. aepim*; 236, *B. tuberculata*; 278, *A. woglumi*; 281, *T. vaporariorum*; 45, *B. tabaci* biótipo BR; 110, *B. tabaci* biótipo B; ag, *A. gemmatalis*; sf, *S. frugiperda*; px, *P. xylostella*; ant, *A. grandis*; ae, *A. aegypti*; C+, seqüência do *primer* BT-B3 clonada no vetor plasmidial pBEM-B7. 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 13).

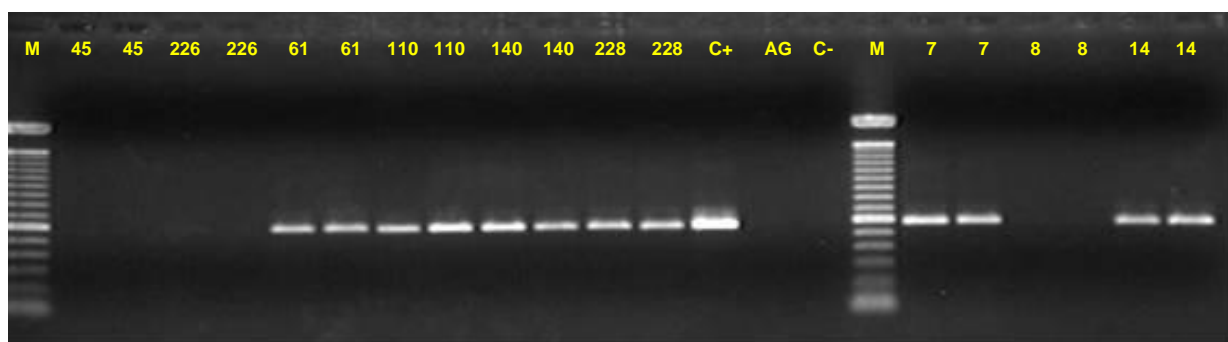


Figura 13 – Teste do *primer* BT-B3 para a detecção do biótipo B de *B. tabaci* quando comparado com outros biótipos de *B. tabaci*. Os números 45 e 226 representam o biótipo BR; 61, 110, 140 e 288 representam o biótipo B; 7 e 14 indicam o biótipo Q; 8, biótipo cassava; ag indica o DNA de *A. gemmatalis*; O código C+ corresponde ao fragmento de RAPD clonado no plasmídio pBEM-B7; 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 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 (DNAmt) 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 *AvaI*, *DdeI* e *Sau3A*. 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, originado 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 14).



Figura 14 – 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 plasmídio pBEM-BR2; C-, corresponde ao controle negativo feito com água. A letra M refere-se ao marcador de massa molecular 100 pb ladder.

Utilizando-se o DNA extraído 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 15).

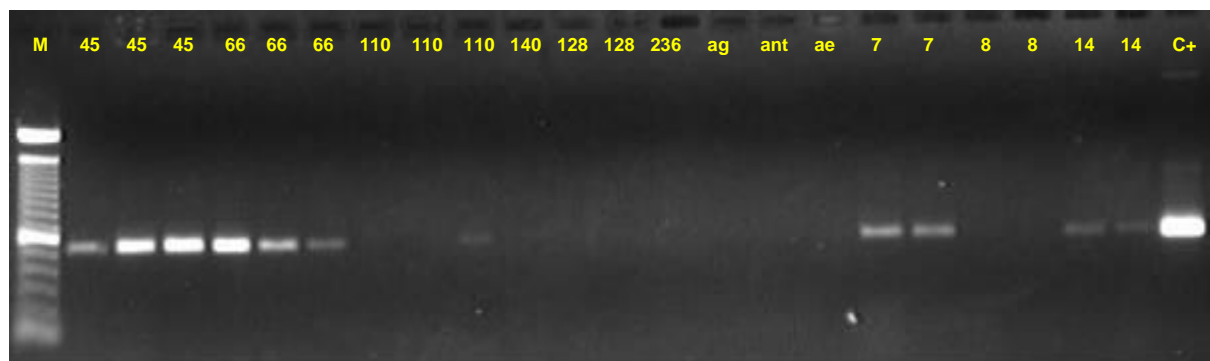


Figura 15 – Teste do *primer* BT-BR1 para a detecção do biótipo BR quando comparado com outros biótipos de *B. tabaci*. Os números 45 e 66 representam o biótipo BR; 110, 128 e 140 representam o biótipo B; 236, *B. tuberculata*; 7 e 14 indicam o biótipo Q; 8, biótipo cassava; ag, *A. gemmatilis*; ant, *A. grandis*; ae, *A. aegypti*; O código C+ corresponde ao fragmento de RAPD clonado no plasmídeo pBEM-BR2. 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* interceptada 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 de 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. Outros 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 utilizadas nas reações de SCAR (Figura 16).

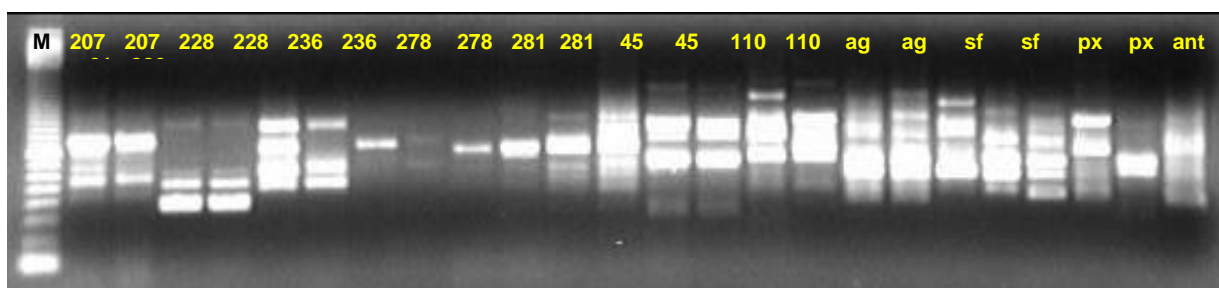


Figura 16 – Perfis de marcadores RAPD obtidos com o *primer* OPA-13 a partir de amostras de diferentes espécies de insetos. Os códigos indicam: 207, *A. cocois*; 228, *A. aepim*; 236, *B. tuberculata*; 278, *A. woglumi*; 281, *T. vaporariorum*; 45, *B. tabaci* biótipo BR; 110, *B. tabaci* biótipo B; 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.

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*.

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. 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

Observou-se 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 na técnica de 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 por meio da técnica de SCAR. Sendo assim, a partir das informações geradas pelos marcadores SCAR, foi possível à organização de um fluxograma para a tomada de decisões quanto à identificação molecular dos biótipos de *B. tabaci* (Figura 17).

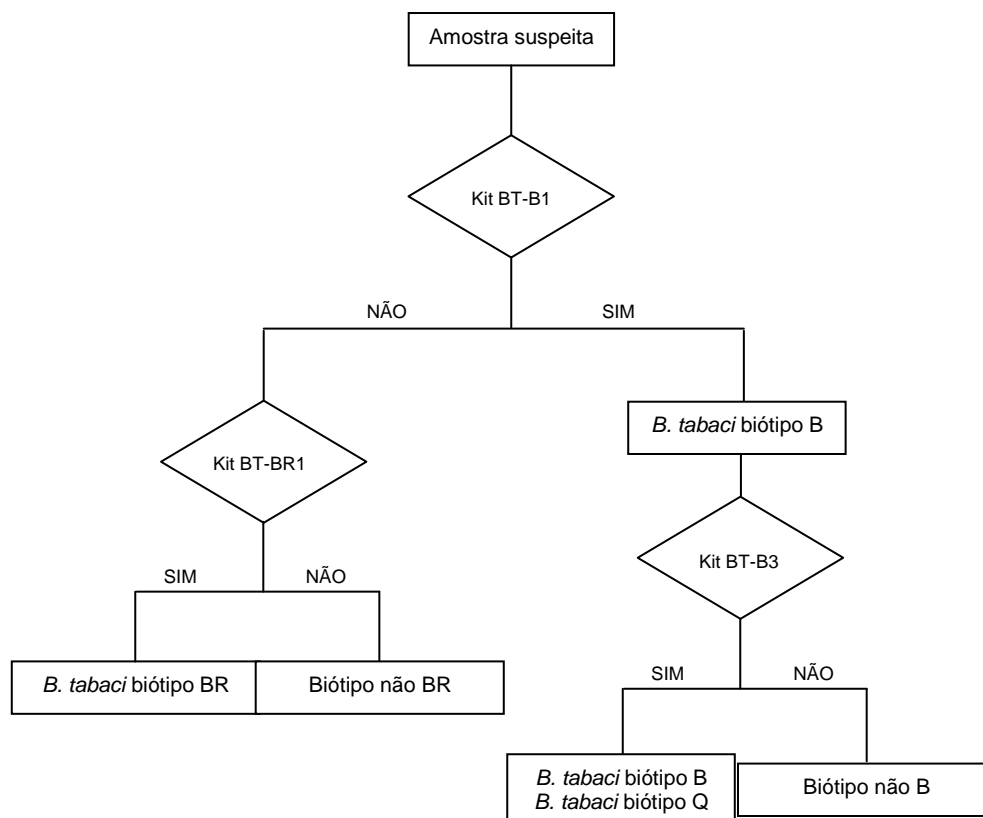


Figura 17 – Fluxograma para a tomada de decisões quanto à utilização dos *primers* de SCAR e para a detecção e a identificação de biótipos de *B. tabaci*.

A vantagem dessa estratégia molecular reside no fato da possibilidade de se reduzir o tempo para a elaboração de laudo quarentenário de 36h para 12h. Isso permite decisões 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. A partir dessas informações foi feito o depósito no INPI do pedido de patente desse método sob o número de protocolo 012060001885 visando futuras aplicações dessa técnica para a detecção de biótipos de *B. tabaci*.

Referências

AGUSTI, N.; VICENTE, M. C. de; 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**, Oxford, UK, v. 8, p. 1467-1474, 1999.

- AGUSTI, N.; VICENTE, M. C. de; GABARRA, R. DEVELOPING SCAR markers to study predation on *Trialeurodis vaporariorum*. **Insect Molecular Biology**, Oxford, GB, v. 9, n. 3, p. 263-268, 2000.
- BORÉM, A.; SANTOS, F. R. dos. Marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; SANTOS, F. R. dos. **Biotecnologia simplificada**. Viçosa: Editora Suprema, 2002.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. V. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 32, p. 314-331, 1980.
- CERVERA, M. T.; CABEZAS, J. A.; SIMON, B.; MARTINEZ-ZAPATER, J. M.; BEITIA, F.; CENIS, J. L. Genetic relationship among biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on AFLP analysis. **Bulletin of Entomological Research**, Wallingford, UK, v. 90, p. 391-396, 2000.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Classes de marcadores moleculares para análise genética. In: FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 20).
- GUIRAO, P.; BEITIA, F.; CENIS, J. L. Biotype determination in Spanish populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Bulletin of Entomological Research**, Wallingford, UK, v. 87, p. 587-593, 1997.
- HOROWITZ, A. R.; DENHOLM, I.; GORMAN, K.; CENIS, J. L.; KONTSEDALOV, S.; ISHAAYA, I. Biotype Q of *Bemisia tabaci* Identified in Israel. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 31, n. 1, p. 1-5, 2003.
- HOROWITZ, A. R.; KONTSEDALOV, S.; KHASDAN, V.; ISHAAYA, I. Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 58, p. 216-225, 2005.
- JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature**, London, v. 316, p. 76-79, 1985.
- 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**, New York, v. 52, p. 193-204, 2003.
- LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, p. 388-396, 1989.
- MALGORN, Y.; COQUOZ, R. DNA typing for identification of some species of Calliphoridae. An interest in forensic entomology. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 102, n. 2/3, p. 111-119, 1999.
- MILACH, S. C. K. **Marcadores de DNA. Aplicações no melhoramento de plantas**. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio05/marcadoresdna.pdf>>. Acesso em: 23 dez. 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**, Brasília, DF, v. 22, n. 1, p. 90-92, 2004.

MOYA, A.; GUIRAO, P.; CIFUENTES, D.; BEITIAS, F.; CENIS, J. L. Genetic diversity of Iberian populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) base on random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. **Molecular Ecology**, Oxford, UK, v. 10, p. 891-897, 2001.

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

QUEIROZ, P. R.; MARTINS, E. S.; MONNERAT, R. G.; LIMA, L. H. C. **Análise da variabilidade genética de uma população de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) por meio de marcadores moleculares RAPD**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 18 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 75).

RABELLO, A. R.; QUEIROZ, P. R.; SIMÕES, K. C.; HIRAGI, C. O.; LIMA, L. H. C.; OLIVEIRA, M. R. V.; MEHTA, A. **Diferenciação de biótipos de *Bemisia tabaci* utilizando PCR-RFLP e sequenciamento da região ITS1 rDNA**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 23 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 95)

RONDA, M.; ADÁN, A.; CIFUENTES, D.; CENIS, J. L.; BEITIA, F. Laboratory evidence of interbreeding between biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) present in Spain. In: INTERNATIONAL PLANT VIRUS EPIDEMIOLOGY SUMPOSIUM, 7., 1999, Aguadulce, Almería. **Abstracts...** [S.l: s.n.], 1999. p. 83-84.

ROSELL, R. C.; BEDFORD, J. D.; FROHLICH, D. R.; BROWN, J. K.; MARKHAM, P. G. Analysis of morphological variation in distinct populations of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, US, v. 90, p. 575-589, 1997.

SHENG, Z. L.; TONG, J.; JING, X.; SHENG, L. S.; ZHANG, Y. J. SCAR molecular markers of the B biotype and two non-B populations of the whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Chinese Journal of Agriculture Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 189-194, 2006.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

ZHANG, G. F.; LÜ, Z. C.; WAN, F. H. Detection of *Bemisia tabaci* remains in predator guts using a sequence-characterized amplified region marker. **Chinese Journal of Agriculture Biotechnology**, v. 123, p. 81-90, 2007.