

**Identificação de Populações de
Insetos-Praga Utilizando Marcadores
Moleculares RAPD.**



Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 167

Identificação de Populações de Insetos-Praga Utilizando Marcadores Moleculares RAPD

Paulo Roberto Queiro
Érica S. Martins
Lílian Botelho Praça
Luzia Helena Corrêa Lima
Rose G. Monnerat

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:

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

- I 19 Identificação de populações de insetos-praga utilizando marcadores moleculares RAPD. / Paulo Roberto Queiroz ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
17 p. : il. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 167)
1. Inseto - praga. 2. Identificação. 3. Marcador molecular. 4. RAPD. I. Queiroz, Paulo Roberto. II. Série.

632.96 – CDD 21.

Identificação de Populações de Insetos-Praga Utilizando Marcadores Moleculares RAPD

Paulo Roberto Queiroz¹
Érica S. Martins²
Lílian Botelho Praça³
Luzia Helena Corrêa Lima⁴
Rose G. Monnerat⁵

Resumo

O uso de produtos tóxicos e de inseticidas de amplo espectro de ação vem fortalecer a necessidade de se encontrar novas alternativas no combate ao ataque de populações de insetos-praga nas regiões agrícolas.

No controle de pragas, o conhecimento das características fenotípicas e genotípicas das populações é um aspecto importante. Neste contexto, as metodologias de marcadores moleculares são instrumentos valiosos na caracterização de populações naturais e poderão auxiliar no estabelecimento do perfil genético de insetos-praga como *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatilis*, *Plutella xylostella*, *Anthonomus grandis*.

Com o objetivo de determinar o perfil molecular dessas quatro populações de insetos, a partir do emprego de cinco oligonucleotídeos de RAPD, obteve-se 340 marcadores que permitiram a construção de um dendrograma. Dessa forma, observou-se que, as populações em estudo foram organizadas em quatro grupos principais, indicando que a maior fonte de variabilidade genética foi originária de variações dentro da população. A partir dessas informações, deduziu-se que os fragmentos característicos de cada espécie, gerados com a utilização de marcadores RAPD, seriam de grande importância no desenvolvimento de métodos para uma identificação mais específica, como os marcadores SCAR. Outrossim, poder-se-ia considerar adoções de medidas fitossanitárias tanto no monitoramento dessas populações quanto no controle da entrada de novas espécies, principalmente em regiões agrícolas isentas de determinadas pragas.

Palavras-chave: Insecta; RAPD; Marcadores moleculares.

¹ Biólogo – Doutor Biologia Animal – Universidade de Brasília – UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cx. Postal 02372, CEP 70.849-970, Brasília, DF. E.mail: queiroz@cenargen.embrapa.br

² Bióloga – Doutoranda Biologia Molecular – Universidade de Brasília – UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cx. Postal 02372, CEP 70.849-970, Brasília, DF. E.mail: erica@cenargen.embrapa.br

³ Engenheira Agrônoma – Mestrado Ciências Agrárias - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cx. Postal 02372, CEP 70.849-970, Brasília, DF. E.mail: lilian@cenargen.embrapa.br

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

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

Abstract

The use of toxic products and insecticides of wide spectrum action it comes to strengthen the need to find new alternatives in the combat to the attack of insect pests' populations in the agricultural areas.

In the pests' control, the knowledge of phenotypes and genotypes characteristics of the populations is an important aspect. In this context, the methodologies of molecular markers are valuable instruments in the characterization of natural populations and they can aid in the establishment of the genetic profile of insect pests as *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatilis*, *Plutella xylostella* and *Anthonomus grandis*.

With the objective of determining the molecular profile of those four populations of insects, starting from five oligonucleotides of RAPD, it was obtained 340 markers that allowed the construction of a dendrogram. It was observed that those populations were organized in four main clusters, indicating that the largest source of genetic variability was original of variations inside of these populations. Also, it was deduced that the characteristic fragments of each species, generated with the use of RAPD markers, would be of great importance in the development of methods for a more specific identification, as the markers SCAR. Likewise, it could be considered phytossanitary measures as the monitoring pest population to avoid spreading and the control at the entrance of new species in the country, mainly in areas free of certain pests.

Introdução

Cerca de 20% das safras de alimentos do mundo são perdidas devido ao ataque de insetos, cujo controle tem sido feito predominantemente com uso de inseticidas químicos (Silva-Filho e Falco, 2000). O uso destes produtos altamente tóxicos e de amplo espectro de ação pode causar conseqüências graves ao homem e ao meio ambiente e o aparecimento de populações de insetos resistentes. Isto indica a necessidade de se conhecer novas alternativas que venham auxiliar no manejo das populações das várias espécies de insetos (Praça et al., 2004). Portanto, a identificação molecular de populações de insetos praga é uma excelente ferramenta para auxiliar em uma estratégia de manejo adequada, já que insetos podem apresentar suscetibilidades variadas a princípios ativos de acordo com a população.

Dessa forma a identificação molecular de populações de insetos-praga surge como uma alternativa importante no monitoramento e manejo em campo de insetos como: *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatilis*, *Plutella xylostella*, *Anthonomus grandis*, entre outros.

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida popularmente como lagarta do cartucho do milho, é uma espécie polífaga que ataca diversas culturas economicamente importantes em vários países. É considerada a mais importante praga do milho no Brasil, podendo também atacar culturas como sorgo, arroz, trigo, alfafa, feijão, amendoim, tomate, algodão, batata, repolho, espinafre, abóbora, couve, entre outras (Cruz et al., 1999; Cruz e Monteiro, 2004; Montesbravo, 2007). Seu ataque ocorre em todos os estágios de desenvolvimento do milho (Cruz et al., 1997), podendo as perdas reduzir a produção em até 38,7% (Cruz et al., 1996; Viana et al., 2006).

A lagarta da soja, *A. gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) é a principal desfolhadora da soja no Brasil, podendo ser encontrada em todos os locais de produção, representando um risco à produtividade dos cultivos de soja no Brasil por chegar a ocasionar 100% de destruição foliar (Gazzoni e Yoriniori, 1995; Moscardi e Souza, 2002). Este inseto causa grandes danos à lavoura de soja, que vão desde o desfolhamento até a destruição completa da planta. A lagarta da soja é um inseto mastigador e se alimenta preferencialmente de folhas jovens. Quando a folhagem é removida, ataca outras partes da planta como pecíolos e haste. O desfolhamento compromete o enchimento das vagens, devido à diminuição da área foliar responsável pela fotossíntese, com conseqüente redução da produção de grãos (Silva et al., 2002).

A traça-das-crucíferas, *P. xylostella* (L. 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) é uma praga causadora de elevados prejuízos em brássicas, tendo por preferência o repolho, podendo ocasionar reduções de até 60% na produção (Biocontrole, 2007) e também pode atacar a

couve-flor e a couve comum (Silva et al., 1993). Ocorre durante todo o ano, tanto no Brasil (Castelo Branco et al., 1996, França e Medeiros, 1998), quanto no Mundo (Kimoto, 1993). As lagartas, a partir do segundo estágio, perfuram as folhas das cabeças de repolho, depreciando o produto e causando danos irreversíveis, prejudicando sua comercialização.

O bicudo do algodoeiro, *A. grandis* Boheman, 1843 (Coleoptera: Curculionidae), considerado a principal praga do algodoeiro nas Américas, é uma das pragas mais pesquisadas no mundo (Busoli et al., 1994; Gallo et al., 2002) e encontrado nos EUA, México, América Central, Cuba, Haiti, Venezuela, Colômbia, Argentina, Paraguai e Brasil. Possui elevado poder de destruição devido a sua alta capacidade reprodutiva e as numerosas gerações que se produzem em um ciclo agrícola (Toledo et al., 2000). Todos os seus estágios se desenvolvem no interior das estruturas de frutificação de plantas hospedeiras e, desta forma, o bicudo está protegido de inúmeros inimigos naturais, das condições adversas do meio ambiente e da ação dos inseticidas (Busoli et al., 1994). Seu ataque está vinculado às condições climáticas, apesar de temperaturas baixas não favorecerem o seu desenvolvimento (Silvie et al., 2001).

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

Os distintos tipos de marcadores moleculares, hoje disponíveis, diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar a variação do DNA e, assim, variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e reprodutibilidade. Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos de acordo com a metodologia utilizada para identificá-los: a) hibridação ou; b) amplificação de DNA. Entre os marcadores identificados por hibridação estão o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – Polimorfismo no Comprimento de Fragmento de Restrição) (Botstein *et al.*, 1980) e os minissatélites ou *locus* VNTR (Variable Number of Tandem Repeats – Número Variável de Repetições *in tandem*) (Jeffreys *et al.*, 1985). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo RAPD (Random

Amplified Polymorphic DNA – DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso) (Williams *et al.*, 1990), SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions – Regiões Amplificadas de Sequências Caracterizadas) (Paran e Micheltore, 1993) e Microssatélite (Litt & Luty, 1989).

O desenvolvimento da Biologia Molecular permitiu então o surgimento de diversos métodos de detecção de polimorfismo genético, tanto bioquímico quanto de ácido nucléico. As principais vantagens do uso dos marcadores moleculares baseados em DNA são: 1) a análise de um grande número de *locus*; 2) a neutralidade em relação a efeitos fenotípicos; 3) a co-dominância, com maior quantidade de informação genética por *locus*; 4) a caracterização do genótipo de um indivíduo a partir de amostras de células ou tecidos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Além disso, marcadores identificados por amplificação, especialmente RAPD, são mais fáceis de se manipular e de custo menor, como também, são muito utilizados na obtenção de informações na análise genômica. 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 necessitando de informações prévias da sequência de DNA da espécie em estudo e demandando 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 dessa técnica reside no fato de que diferentes indivíduos produzem diferentes perfis de fragmentos de amplificação (Milach, 2005).

Ainda, a respeito dos padrões de polimorfismo gerados pela técnica de RAPD, observa-se que uma característica deste tipo de marcador é o seu comportamento como marcador genético dominante. Lembrando que a dominância, neste caso, não se refere à interação genética entre alelos de um mesmo *locus* e sim a interpretação relativa entre fenótipo e genótipo (Ciampi & Magalhães, 2001).

Sendo assim, as metodologias de marcadores moleculares fornecem hoje, valiosos instrumentos para a caracterização de populações naturais. Esses instrumentos tais como, o estudo da variação de proteínas (isoenzimas) e da variação do DNA (RAPD) poderá fornecer marcadores específicos para espécies de insetos de interesse agrônomo. O uso de marcadores moleculares específicos tem como vantagem principal a sua facilidade de detecção além de permitir o seu uso em associação a estudos de identificação de espécies, o estabelecimento de relações filogenéticas entre diferentes espécies ou populações e a construção de mapas genéticos de interesse econômico. Os marcadores apresentam

muitas vantagens, pois independem do estágio de desenvolvimento do organismo e não são influenciados pelas condições ambientais (Haymer, 1994).

Um aspecto importante no controle de pragas é o conhecimento de suas características fenotípicas e genotípicas. Dessa forma, informações geradas por marcadores RAPD poderão auxiliar no estabelecimento do perfil genético dos insetos e serão de grande importância no monitoramento de populações com genes resistentes a inseticidas químicos ou agentes de biocontrole, no estudo da dispersão das populações e no controle da entrada de novas pragas em regiões agrícolas do Brasil, livres da ação de determinados insetos-praga.

Material e Métodos

Objetivo

Utilizando-se das informações geradas pela técnica de RAPD, determinou-se o perfil de marcadores moleculares e a variabilidade genética existente entre quatro populações de insetos-praga de interesse agrícola.

Insetos utilizados na análise molecular

Foram utilizados vinte indivíduos coletados aleatoriamente a partir de colônias dos insetos-praga *A. gemmatilis*, *A. grandis*, *P. xylostela* e *S. frugiperda* estabelecidas no laboratório de criação de insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Para a análise molecular das populações de insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera foram utilizadas larvas em seu terceiro instar de desenvolvimento que foram mantidas em etanol 100 % a – 20 °C até o momento do uso.

Obtenção de ácido nucléico total

Para os estudos de caracterização molecular, o DNA de vinte indivíduos de terceiro instar 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). Submeteu-se uma larva de terceiro instar à maceração e, a seguir, adicionou-se 500 µL de tampão de extração (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,3 % e Proteinase K 120 µg.mL⁻¹), incubando-se por 60 min a 65 °C. O homogenato foi centrifugado por 10 min a 10.000xg e, o sobrenadante, transferido para um tubo plástico. Adicionou-se 500 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e as fases foram homogeneizadas em vortex por 5 s. O material foi centrifugado por 10 min a 10.000xg e a 10 °C. A fase aquosa foi então transferida para um novo tubo plástico, repetindo-se a etapa anteriormente descrita.

O DNA foi precipitado pela adição de 30 µL de NaCl 5 M e 1 mL de etanol absoluto incubando-se por 16 h a – 20 °C. Após centrifugação a 10.000xg por 10 min a 10 °C, o DNA precipitado foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70 %, seco à temperatura ambiente, ressuspensão em TE 0,1 X (Tris-HCl 1 mM pH 8, EDTA 0,1 mM) e armazenado a – 20 °C. Para as análises de RAPD, utilizou-se o DNA diluído 10 X (aproximadamente 100 ng) em TE 0,1 X.

Reações de RAPD

Para os estudos de caracterização molecular, O DNA extraído a partir de cinco indivíduos de cada população foi utilizado em 30 µL de uma reação de RAPD contendo 24,9 µL de água milliQ, 3,0 µL de tampão 10 X (Amersham Bioscience), 1,2 µL de *primer* 10 µM (Operon technologies, Inc., CA, USA) (Tabela 1), 0,6 µL de dNTP's (10 mM) e 0,3 µL de *Taq* DNA polimerase na concentração de 5 U.µL⁻¹ (Amersham) e 5 µL (20 ng) de DNA.

Tabela 1 – Seqüência dos oligonucleotídeos de RAPD utilizados na determinação dos perfis eletroforéticos das diversas populações de insetos submetidas a análise molecular.

<i>Primer</i>	Seqüência (5' → 3')
OPA-03	AGT CAG CCA C
OPA-04	AAT CGG GCT G
OPA-10	GTG ATC GCA G
OPA-11	CAA TCG CCG T
OPA-13	CAG CAC CCA C

Obtenção de perfis eletroforéticos

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

Análise por eletroforese dos fragmentos de dna gerados por RAPD

Os produtos de amplificação originários das reações de RAPD foram separados em gel de agarose 1,5 %, submerso em tampão TBE 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 1 mM) durante 3 h a 160 V. Ao término da corrida, os géis foram corados por 30 min em uma solução corante contendo brometo de etídio (5 µg.mL⁻¹), descorados por 30 min em água destilada e fotografado sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 300 nm. A documentação fotográfica foi feita usando-se o sistema EagleEye II still video system™ (Stratagene). Em todos os géis, marcadores de massa molecular (100 bp Ladder - INVITROGEN) foram usados para a determinação da massa molecular dos fragmentos amplificados pela técnica de RAPD.

Análise dos dados

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

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

Resultados

A partir do emprego dos cinco oligonucleotídeos de RAPD, foram obtidos perfis eletroforéticos característicos para os indivíduos dentro de cada uma das quatro populações de inseto-praga de interesse agrônômico (Figura 1).

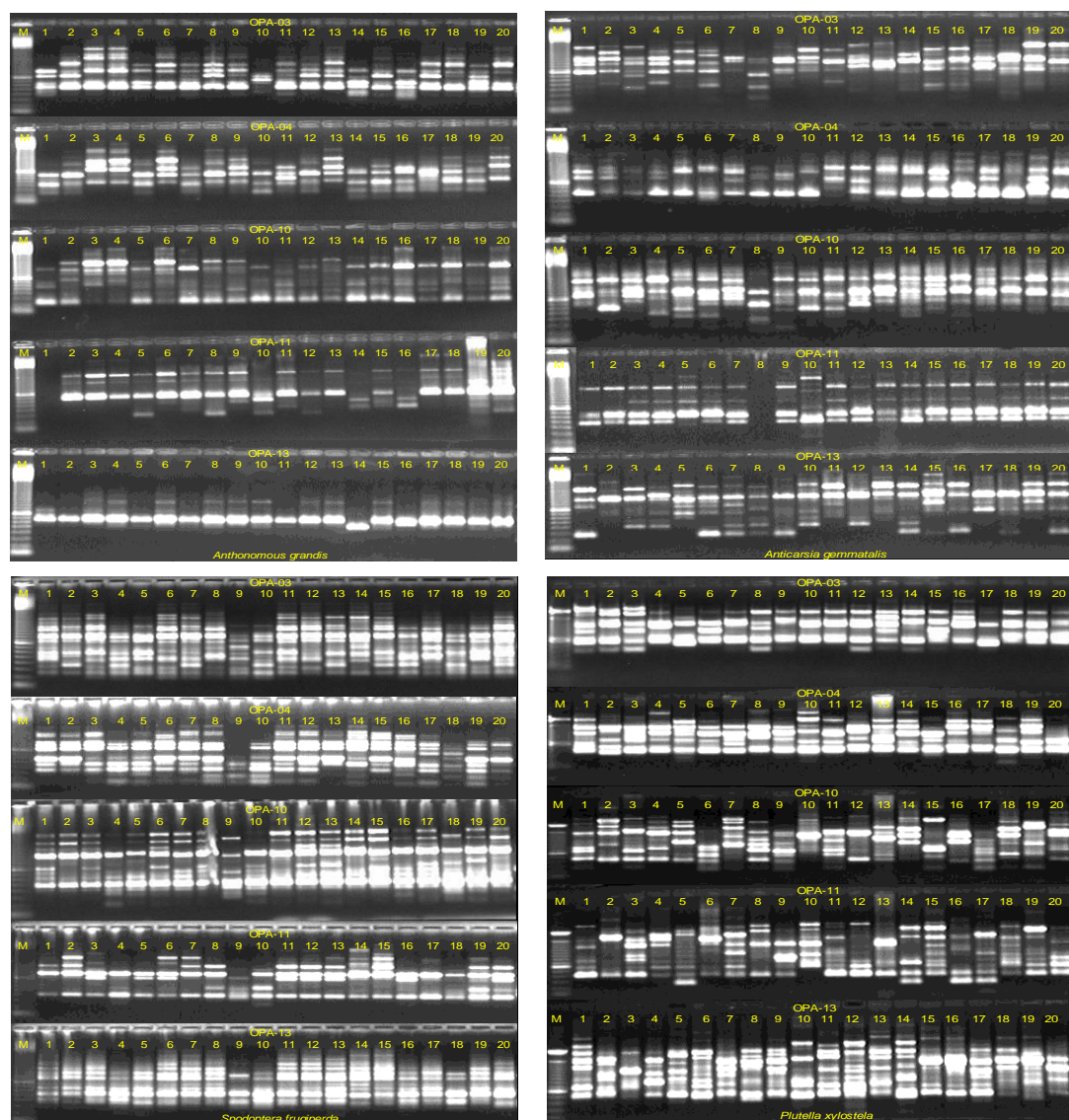


Figura 1 – Gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídio revelando o perfil eletroforético obtido com o emprego de cinco oligonucleotídeos por meio da técnica de RAPD a partir da análise de vinte indivíduos de cada uma das quatro populações de inseto-praga de interesse agrônômico.

Por exemplo, para *A. grandis* observou-se com o emprego do oligonucleotídio OPA-03, fragmentos característicos de 550 pb e 1000 pb. Com o *primer* OPA-04 foram observados dois perfis eletroforéticos dentro da população de *A. grandis* de tal forma que, os indivíduos 1, 2, 5, 7, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18 e 19 produziram fragmentos de 400 pb e 750 pb e os indivíduos 3, 4, 6, 8, 9, 13 e 20 geraram fragmentos de 850 pb e 1300 pb. Utilizando-se o *primer* OPA-10 foram identificados dois fragmentos de 250 pb e 1200 pb. Com o oligonucleotídio OPA-11 obteve-se um fragmento de 750 pb comum a todos os indivíduos dessa população de inseto. Um fragmento de 750 pb também foi observado com o oligonucleotídio OPA-13 em todos os indivíduos de *A. grandis* analisados nesse estudo.

A análise da população de *A. gemmatilis* com o *primer* OPA-04 gerou um fragmento de 550 pb e o *primer* OPA-13 produziu um fragmento de 1600 pb. Para o oligonucleotídio OPA-10 foram produzidos dois fragmentos de 850 pb e 1700 pb e, com o *primer* OPA-11 foram obtidos dois fragmentos de 550 pb e de 700 pb.

Analisando-se a população de *S. frugiperda* o *primer* OPA-03 produziu um fragmento de 1000 pb. Para o oligonucleotídio OPA-04 foram gerados dois fragmentos de 350 pb e de 550 pb. Com o *primer* OPA-10 foram gerados dois fragmentos de 500 pb e de 1200 pb. Já para o oligonucleotídio OPA-11 foram obtidos dois fragmentos de 450 pb e de 1000 pb. E, por último, o *primer* OPA-13 gerou dois fragmentos de RAPD de 550 pb e de 950 pb.

Para a população de *P. xylostella*, os *primers* OPA-03, OPA-04 e OPA-11 produziram fragmentos característicos a essa espécie de 600 pb, 450 pb e 450 pb, respectivamente. A seguir, utilizando-se os cinco *primers* de RAPD foram gerados 340 fragmentos de DNA (Tabela 2).

Tabela 2 – Número total de fragmentos de DNA produzidos por cinco *primers* de RAPD a partir da análise de quatro populações de insetos-praga de interesse agrônômico.

Espécie	Primer de RAPD					Total
	OPA-03	OPA-04	OPA-10	OPA-11	OPA-13	
<i>A. gemmatilis</i>	14	7	11	4	10	46
<i>A. grandis</i>	10	7	6	6	3	32
<i>P. xylostella</i>	8	9	12	10	11	50
<i>S. frugiperda</i>	10	9	8	7	8	42
Total	42	32	37	27	32	340

Pelos dados de marcadores obtidos, observou-se que as espécies de lepidópteras *P. xylostella* e *A. gemmatilis* produziram o maior número de bandas de RAPD com, 50 e 46 fragmentos, respectivamente. A espécie de coleóptero *A. grandis* produziu o menor número de fragmentos de RAPD com 32 bandas. Além disso, observou-se que os *primers* OPA-03 e OPA-10 foram os que geraram o maior número de fragmentos de RAPD por espécie, com 42 e 37 bandas, respectivamente. O *primer* de RAPD menos informativo foi o OPA-11, que gerou 27 fragmentos de RAPD.

Em média, cada *primer* produziu $8,5 \pm 1,4$ fragmentos de RAPD para cada espécie de inseto-praga de interesse. Além disso, observou-se que do total de fragmentos de DNA obtidos, 10,9 % eram monomórficos e 39,1 % apresentaram polimorfismo (Tabela 3).

Tabela 3 – Número de fragmentos polimórficos e monomórficos gerados pelo emprego dos *primers* de RAPD.

Tipo de fragmento	OPA-03	OPA-04	OPA-10	OPA-11	OPA-13
Polimórfico	34	22	30	21	26
Monomórfico	8	10	7	6	6
Total	42	32	37	27	32

Das informações obtidas, observou-se que os *primers* OPA-03 e OPA-10 apresentaram o maior grau de fragmentos polimórficos por espécie, enquanto os *primers* OPA-04 e OPA-11 foram os menos informativos. Além disso, observou-se que o *primer* OPA-04 foi o que produziu o maior número de fragmentos monomórficos por espécie. A partir dessas informações foi possível definir, dentro do espectro de marcadores RAPD analisados, oligonucleotídios úteis para a rápida identificação das espécies de insetos-praga de interesse agrônômico (Tabela 4).

Tabela 4 – Fragmentos de DNA gerados por oligonucleotídios de RAPD candidatos a uso para a rápida identificação de quatro espécies de insetos-praga de interesse agrônômico.

Espécies	Oligonucleotídio de RAPD	Fragmento de DNA (pb)
<i>A. grandis</i>	OPA-11	750
<i>A. gemmatalis</i>	OPA-11	550 e 700
<i>P. xylostella</i>	OPA-03	600
<i>S. frugiperda</i>	OPA-04	350 e 550

A partir do emprego dos cinco oligonucleotídios mais polimórficos de RAPD foram obtidos 340 marcadores que serviram para a elaboração do *score* para a determinação do grau de similaridade genética entre as populações de insetos-praga analisadas nesse estudo. A análise pelo programa NTSYS-pc permitiu organizar as populações em quatro grupos distintos (Figura 2).

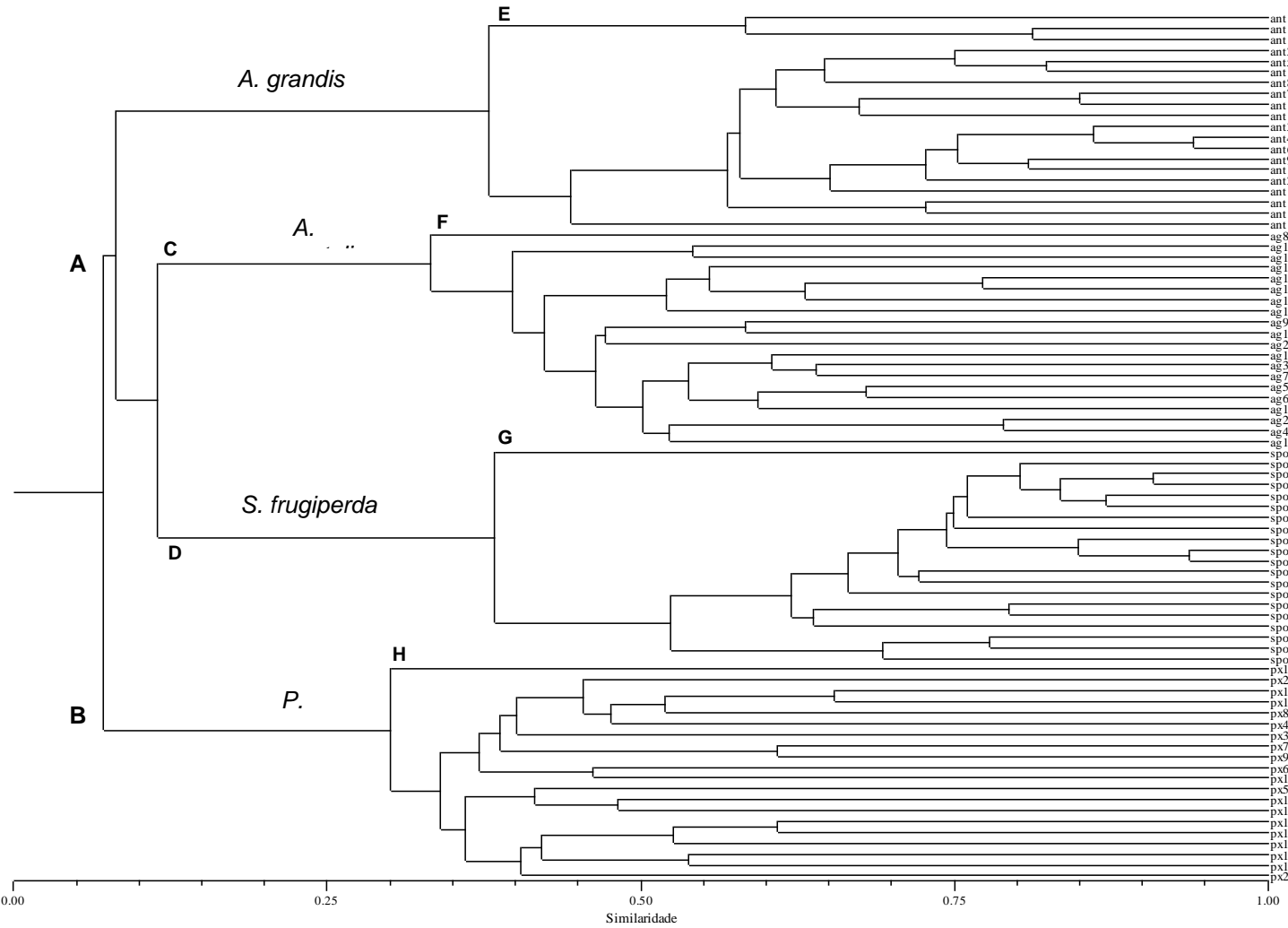


Figura 2 - Grau de similaridade genética entre as quatro populações de insetos-praga de interesse agrícola obtido a partir da análise de 107 marcadores gerados a partir do emprego de cinco oligonucleotídeos decaméricos de RAPD submetidos a análise pelo programa NTSYS-pc.

A obtenção do dendrograma permitiu definir dois grupos principais de tal forma que, no grupo A, foram encontradas as populações de *A. grandis*, *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* e, no grupo B, os indivíduos de *P. xylostella* que apresentaram 7 % de similaridade genética em relação às demais populações do estudo.

Analisando-se as populações do primeiro grupo (A) observou-se que *A. grandis* apresentou 8 % de similaridade em relação a *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*. Além disso, *A. grandis* formou um clado distinto em relação às outras duas populações. As populações de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* formaram um único clado e apresentaram 12 % de similaridade entre os seus indivíduos.

Analisando-se a amplitude de variabilidade genética encontrada dentro de cada população, observou-se que: a) *A. grandis* apresentou amplitude variando de 37,5 % a 93,5 %; b) *A. gemmatalis* variando de 34 % a 79 %; c) *S. frugiperda* com variação de 38 % a 93 %; e d) *P. xylostella* com amplitude de 30 % a 66 %. De todas as análises observou-se que as populações de *A. grandis* e *S. frugiperda* apresentaram as maiores amplitudes de similaridade genética variando em 56 % e 55 %, respectivamente.

Ainda, pela organização dentro de cada população observou-se que alguns indivíduos apresentaram perfis de similaridade genética diferente em relação aos demais indivíduos dentro de cada população de inseto-praga. Por exemplo, para: a) *A. grandis*, os indivíduos 1, 14 e 16 apresentaram similaridade genética de 37,5 %; b) *A. gemmatalis*, o indivíduo 8 com similaridade de 34 %; c) *S. frugiperda*, o indivíduo 9 com similaridade de 38 %; e d) *P. xylostella*, o indivíduo 14 apresentou similaridade genética de 30 %.

Utilizando-se os mesmos dados binários que foram aplicados na geração do dendrograma, a análise de variância molecular (AMOVA) de todas as populações de insetos-praga permitiu identificar que a maior fonte de variabilidade genética (60,40 %) era originária de variações entre as populações e que 39,60 % da variação era originária das variações dentro das populações. Além disso, analisando-se apenas a fonte de variabilidade entre as espécies de lepidópteros, observou-se que 58,97 % da fonte de variação era originária de variações entre as populações e que 41,03 % era proveniente de variações dentro das populações.

Discussão

Perfis eletroforéticos de fragmentos de DNA gerados por RAPD têm sido utilizados para a identificação molecular de espécies de insetos. Por exemplo, em 1993, Gawel e Bartlett utilizaram a técnica de RAPD para o estudo de *Bemisia tabaci*. Utilizando vinte *primers* de RAPD, os autores distinguiram dois biótipos de ocorrência nas culturas dos Estados Unidos: os biótipos A e B. Em função desses resultados, os autores apontam para a aplicação do RAPD na diferenciação de biótipos de *B. tabaci* que apresentem semelhança morfológica e proximidade genética.

Além disso, De Barro & Driver (1997) sugerem que a técnica de RAPD é adequada para a análise de insetos, pois permite utilizar amostras frescas ou conservadas em álcool para critérios de identificação de espécies.

Em 2003, Léry *et al.* usando a técnica de RAPD caracterizaram 11 linhagens celulares de insetos, incluindo seis espécies de insetos da ordem Lepidoptera, uma espécie de Diptera e quatro de Coleoptera. Os autores observaram que os perfis eletroforéticos apresentaram diferenças entre as espécies do mesmo gênero (por exemplo, para

Spodoptera), como também, entre as espécies de gêneros diferentes. Além disso, foram observadas diferenças nos perfis eletroforéticos entre as espécies quando foram empregados diferentes *primers* de RAPD. Os autores concluíram a possibilidade do emprego de *fingerprints* gerados por RAPD para a identificação de linhagens celulares específicas a partir de uma dada amostra de uma espécie de inseto em particular.

Martinelli *et al.* (2006) analisaram a variabilidade genética entre dez populações de *S. frugiperda* coletadas em milho (*Zea mays*) e algodão (*Gossypium hirsutum*) utilizando a técnica de RAPD. A partir dos 206 fragmentos de RAPD analisados, os autores observaram que 98 % desses marcadores eram polimórficos. Os resultados obtidos sugeriram a ocorrência de considerável fluxo gênico entre as populações de *S. frugiperda* estabelecidas nas culturas de milho e algodão localizadas em uma mesma região do Brasil.

A importância do emprego da técnica de RAPD na análise molecular de espécies de insetos de interesse agrícola está relacionada com a identificação de fragmentos de RAPD que sejam específicos a uma dada espécie de inseto. Uma vez identificados esses fragmentos, novos marcadores podem ser desenvolvidos para a identificação molecular mais precisa da espécie de interesse. Por exemplo, Agusti *et al.* (1999) descrevem o desenvolvimento de marcadores SCAR para a detecção de *Helicoverpa armigera* no intestino de possíveis predadores. Um fragmento de 1200 pb resultante da amplificação por RAPD usando o DNA de *H. armigera* permitiu o desenho de três conjuntos de *primers* sendo que dois desses foram capazes de detectar vestígios de *H. armigera* no intestino médio do seu predador *Dicyphus tamaninii* mesmo após 4 h da ingestão dos ovos de *H. armigera*.

A mesma estratégia aplicada para *H. armigera*, foi aplicada por Agusti *et al.* (2000) para estudos com *Trialeurodes vaporariorum* para detectar vestígios dessa mosca branca no intestino do predador *D. tamaninii*. A partir de um fragmento de 2400 pb gerado por RAPD e presente apenas em *T. vaporariorum*, foram gerados dois jogos de *primers* sendo que, apenas um foi capaz de detectar essa mosca branca no intestino do seu predador. Como esperado, o marcador SCAR foi identificado em todos os estágios de vida da mosca branca. Esses resultados indicaram a possibilidade de seleção de determinados fragmentos de DNA, gerados por RAPD e específicos para cada espécie, para o desenvolvimento de *kits* para a identificação das mesmas.

Esses dados indicam e demonstram a variabilidade genética existente dentro e entre algumas das populações de insetos-praga de interesse agrícola. Essas avaliações são particularmente importantes no que diz respeito a seleção de fragmentos de RAPD potenciais para o desenvolvimento de *kits* que sejam sensíveis e eficientes para a detecção e a identificação de espécies de insetos de interesse agrícola. A partir dessas informações poderão ser desenvolvidas estratégias moleculares para o monitoramento e o controle da dispersão de insetos que sejam de interesse agrônomo, como também, para a associação com outras características biológicas, tais como, a resistência a inseticidas químicos e a susceptibilidade a ação de bactérias entomopatogênicas.

Conclusão

O emprego de *primers* de RAPD permitiu obter perfis eletroforéticos específicos para a identificação de quatro espécies de insetos de interesse agrônomo, tais como, *A. grandis*, *A. gemmatilis*, *P. xylostella* e *S. frugiperda*. A partir do emprego de cinco oligonucleotídeos de RAPD foram obtidos 340 marcadores que permitiram obter um dendrograma onde as populações em estudo foram organizadas em quatro grupos principais, indicando que a maior fonte de variabilidade genética era originária de variações dentro da população. Os fragmentos de RAPD específicos para cada espécie poderão ser usados no desenvolvimento de marcadores SCAR para a identificação específica de populações desse inseto e para o monitoramento das mesmas em campo.

Referência

BROWN, J.K.; FROHLICH, D.R.; ROSSEL, R.C. The sweet potato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? Annual Review of Entomology, v.40, 1995.

BROWN, S.; MCLAUGHLIN, W., JEREZ, I.T. & BROWN, J.K. Identification and distribution of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) haplotypes in Jamaica. Tropical Agriculture 79(3):140-149. 2002.

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

DE BARRO, P.J.; DRIVER, F. Use of RAPD PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). Australian Journal Entomology, v. 36, p. 149-152, 1997

DE BARRO, P.J., DRIVE, F., TREMAN, J.W. & CURRAN, J.. Phylogenetic relationship of world populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) using ribosomal ITS1. Molecular Phylogenetic Evolution, v. 16, p. 29-36, 2000.

GAWEL, N.J. & BARTLETT, A.C. Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. Insect Molecular Biology. 2, 33-38. 1993.

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

LIMA, L. H. C.; CAMPOS, L.; MORETZSOHN, M. C., FERREIRA D. N. M; RIBEIRO E SILVA, O. L., OLIVEIRA, M. R. V. Populações de *Bemisia tabaci* (Gennadius) raça B no Brasil: análise da diversidade genética por RAPD. Pesquisa em Andamento, nº 22, Dez/99, p.1-6, EMBRAPA/ CENARGEN, 1999.

LIMA, L.H.C.; NÁVIA, D.; INGLIS, P.W ; OLIVEIRA, M.R.V.. Survey of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera:Aleyrodidae) biotypes in Brazil using RAPD markers. Genetics and Molecular Biology, v. 23(4), p. 1-5, 2000.

LIMA, L. H. C.; CAMPOS, L.; MORETZSOHN, M. C.; NÁVIA D.; OLIVEIRA, M. R. V. Genetic Diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) Populations in Brazil Revealed by RAPD Markers. Genetics and Molecular Biology, v. 25(2), p. 217-223, 2002.

MOYA, A., GUIRAO, P., CIFUENTES, D., BEITIA, F. & CENIS, J.L. Genetic diversity of Iberian populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. Molecular Ecology 10(4):891-897. 2001.

MORALES, F.J. & ANDERSON, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. Archives of virology 146:415-441. 2001.

PERRING, T.M.; COOPER, A.D.; RODRIGUEZ, R.J.; FARRAR, C.A.; BELLWS T.S. Identification of a whitefly species by genomic and behavioural studies. Science 259, 74-77. 1993.

PERRING, T. M. The *Bemisia tabaci* species complex. Crop Protection 20, 725-737.2001.

ROHLF, F.J. NTSYS-pc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system, vers. 1.80. Applied Biostatistics Inc., NY, 1993.

SIMON, B., CENIS, J.L., DEMICHELIS, S., RAPISARDA, C., CACIAGLI, P. & BOSCO, D. Survey of *Bemisia tabaci* (Hemiptera:Aleyrodidae) biotypes in Italy with the description of a new biotype (T) from Euphorbia characias. Bulletin of Entomological Research 93(3):259-264. 2003.

VISCARRET, M.M., TORRES-JEREZ, I., AGOSTINI DE MANERO, E., LÓPEZ, S.N., BOTTO, E.E. & BROWN, J.K. Mitochondrial DNA evidence for a distinct new world group of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemíptera:Aleyrodidae) indigenous to Argentina and Bolívia, and presence of the old world B biotype in Argentina. Annals of the Entomological Society of America 96(1):65-72. 2003.