INSTITUTO AGRONÔMICO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Bemisia tabaci* (GENN.) (HEMIPTERA:ALEYRODIDAE) EM DIFERENTES CULTURAS E LOCALIDADES BRASILEIRAS

FERNANDA von HERTWIG MASCARENHAS FONTES

Orientador: André Luiz Lourenção
Co-orientador: Carlos Augusto Colombo

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Agricultura Tropical e Subtropical, Área de Concentração em Tecnologia da Produção Agrícola.

Campinas, SP
Março 2010

Ficha elaborada pela bibliotecária do Núcleo de Informação e Documentação do Instituto Agronômico

F683d Fontes, Fernanda von Hertwig Mascarenhas

Diversidade genética de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera:Aleyrodidae) em diferentes culturas e localidades brasileiras / Fernanda von Hertwig Mascarenhas Fontes. Campinas, 2010. 57 fls.

Orientador: André Luiz Lourenção
Co-Orientador: Carlos Augusto Colombo
Dissertação (Mestrado em Concentração em Tecnologia da Produção Agrícola) – Instituto Agronômico

1. *Bemisia tabaci* - biótipo B 2. Genética populacional
3. Mosca-branca. 4. RAPD 5. SSR. I. Lourenção, André Luiz
II. Colombo, Carlos Augusto III. Título

CDD. 595.7

"O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desenquieta.
O que ela quer da gente é coragem".

João Guimarães Rosa

Aos meus amados pais,

Antonio Fernando e Tatiana

DEDICO

Ao Rafael, e às minhas queridas irmãs,

Tarsilla e Renata,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- A Deus;
- Ao Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e ao Programa de Pós-Graduação pela oportunidade de realizar esse estudo;
- Ao meu orientador, Dr. André Luiz Lourenção, e co-orientador, Dr. Carlos Augusto Colombo, minha imensa gratidão pela confiança depositada em mim na realização desse trabalho, por todos os ensinamentos e amizade construídos nesse período;
- Ao Dr. Walter José Siqueira pela colaboração, amizade e risadas;
- Ao Dr. Celso Omoto por sua disponibilidade em participar dessa banca e pelas ótimas sugestões para aprimorar ainda mais o trabalho;
- A Dra. Regina Priolli pela disposição em me ajudar;
- Aos professores da Pós-Graduação por todos os ensinamentos transmitidos nas disciplinas ministradas;
- Ao Dr. Philip Stansly e Dr. Jose Castillo, da Universidade da Flórida (EUA), pelo material cedido e pela disposição em me mostrar todo o funcionamento do seu laboratório;
- Às funcionárias da Pós-Graduação pela prontidão em atender;
- À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida;
- Às minhas companheiras de laboratório: Paula Lima, Barbinha, Aline e Lucianinha por toda a ajuda e por deixarem os dias mais alegres;
- Aos meus amigos da turma da Pós-Graduação pelas horas de descontração, estudo e companheirismo;
- Enfim, a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO x
ABSTRACT xi
1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO DE LITERATURA 3
2.1 *Bemisia tabaci*: Aspectos Biológicos 3
2.2 Origem e Disseminação 5
2.3 Plantas Hospedeiras 6
2.4 *Bemisia tabaci* biótipo B 9
2.5 Complexo de Espécies 11
2.6 Marcadores Moleculares na Genética de Populações 13
3 MATERIAL E MÉTODOS 15
3.1 Locais de Coleta 15
3.2 Sexagem dos Insetos 17
3.3 Teste de Prateamento da Folha de Aboboreira 17
3.4 Obtenção do DNA 18
3.5 RAPD-PCR 18
3.6 SSR-PCR 19
3.7 Análises Estatísticas dos Dados 21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 22
4.1 Teste de Prateamento da Folha de Aboboreira 22
4.2 RAPD-PCR 23
4.3 SSR-PCR 26
4.3.1 Seleção dos locos encontrados em literatura 26
4.3.2 Desenvolvimento de locos SSR 27
4.4 Parâmetros de Diversidade Genética 27
4.4.1 Equilíbrio de Hardy - Weinberg 29
4.5 Estrutura Genética das Populações 30
4.5.1 Estruturação a partir de distâncias genéticas e do modelo UPGMA 33
4.5.2 Estruturação a partir do programa Structure 35
4.5.3 Estruturação a partir do método de componentes principais 36
4.5.3 Estruturação genética comparando o programa Structure e o método de componentes principais 40
4.5.3 Estruturação por planta hospedeira e por localização geográfica 41
4.6 Perspectivas 46
5 CONCLUSÕES 46
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 48
7 Anexo 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Local de coleta, posição geográfica, altitude, planta hospedeira, número de indivíduos utilizados para as análises por RAPD e SSR e código das populações de *Bemisia tabaci* 16

Tabela 2 - Locos microssatélites utilizados em *Bemisia tabaci* com seus respectivos motivos, temperatura de reassociação, concentração de $MgCl_2$, amplitudes alélicas, número de alelos e número de acesso no Genbank. 20

Tabela 3 - Número de indivíduos, número médio de alelos/loco SSR e estimativas de parâmetros genéticos de diversidade (heterozigosidades esperada – H_e e observada – H_o) em oito populações de *Bemisia tabaci*..... 28

Tabela 4 - Probabilidades do Teste Exato de Fisher para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg obtidas para oito locos SSR em oito populações de *Bemisia tabaci*. 29

Tabela 5 - Teste "U" realizado para verificar desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg por deficiência de heterozigotos para todos os locos em todas as populações de *Bemisia tabaci* do estudo. 30

Tabela 6 - Estimativas das estatísticas F de Wright, em oito populações de *Bemisia tabaci* a partir de oito locos microssatélites. Intervalo de confiança (IC) de 95% de probabilidade... 30

Tabela 7 - Valores de F_{IS} e seus respectivos intervalos de confiança calculados para diferentes populações de *Bemisia tabaci* a partir de oito locos microssatélites (SSR). 31

Tabela 8 - Valores de F_{ST} calculados entre as populações de *Bemisia tabaci* a partir de oito locos microssatélites (SSR)..... 32

Tabela 9 - Distâncias genéticas de NEI (1978), calculadas entre oito populações de *Bemisia tabaci*. 34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – 2 Indivíduos de *Bemisia tabaci* sobre a superfície de uma folha. 1. Detalhe de um indivíduo em meio aos ovos e às pilosidades da folha. 2. Vários indivíduos da praga colonizando a superfície abaxial de uma folha. 3

Figura 3 - Representação esquemática do ciclo de vida de *Bemisia tabaci*, de ovo a adulto. 4

Figura 4 - Fruto do tomateiro apresentando amadurecimento irregular decorrente de desordem fisiológica causada por *Bemisia tabaci*. 8

Figura 5 - Folha de planta de aboboreira apresentando sintomas de prateamento causados por *Bemisia tabaci* biótipo B. 10

Figura 6 - Plantas de feijoeiro apresentando sintomas do mosaico-dourado causado por vírus transmitido por *Bemisia tabaci*. 11

Figura 7 - Mapa do Brasil com os locais de coleta das populações de *Bemisia tabaci*. Letra A no mapa refere-se à cidade de Campinas, SP; letra B, a Monte Mor, SP; letra C, a Capão Bonito, SP; letra D, a São Gotardo, MG; letra E, a Mucugê, BA; letra F, à cidade de Rondonópolis, MT e letra G, a Brasília, DF. 16

Figura 8 - Diferenças morfológicas entre representantes feminino (A) e masculino (B) de mosca-branca (*Bemisia tabaci*), com destaque para o tamanho do inseto e formato do abdômen. 17

Figura 9 - Esquema para representação dos procedimentos adotados na construção da biblioteca enriquecida por microssatélites. 19

Figura 10-11 - Plantas de aboboreiras. 10. Planta da esquerda refere-se ao controle (não infectada) e planta da direita infectada e com sintoma (prateamento das folhas). 11. Detalhe da planta infectada. 23

Figura 12 - Dendrograma representando a diversidade genética de populações de *Bemisia tabaci* ocorrendo em diferentes locais e culturas no Brasil, obtido a partir da média do índice de similaridade de Jaccard. SSP: soja – Campinas (SP); BSP: batata – Monte Mor (SP); SMT: soja – Rondonópolis (MT); AMT: algodão – Rondonópolis (MT); RDF: repolho – Brasília (DF). 24

Figura 13 - Estruturação da divergência genética entre oito populações de *Bemisia tabaci*, definida pelo método UPGMA de agrupamento, a partir nas das distâncias genéticas de Nei (1978). SSP: soja **–** Campinas (SP); BSP: batata **–** Monte Mor (SP); BMG: batata – São Gotardo (MG); RUS: repolho – Immokalee (FL – EUA); BBA: batata – Mucugê (BA); FSP: feijão – Capão Bonito (SP); SMT: soja **–** Rondonópolis (MT); RDF: repolho **–** Brasília (DF) 34

Figura 14 - Teste de atribuição dos indivíduos de *Bemisia tabaci* (K=2). Barras verticais representam indivíduos. A mesma cor em indivíduos diferentes indica que eles pertencem ao mesmo grupo. Cores diferentes no mesmo indivíduo indicam a porcentagem do genoma compartilhado com cada grupo. Os números em cada barra vertical indicam o número do indivíduo e a respectiva população a qual pertence (entre parênteses). 36

Figura 15 - Plano representado pelas coordenadas 1 e 2 da análise de componentes principais a partir de distâncias genéticas (NEI, 1978) obtidas do marcador molecular SSR entre as populações de *Bemisia tabaci* analisadas neste estudo. SSP: soja – Campinas (SP); BSP: batata – Monte Mor (SP); BMG: batata – São Gotardo (MG); RUS: repolho – Immokalee (FL – EUA); BBA: batata – Mucugê (BA); FSP: feijão – Capão Bonito (SP); SMT: soja – Rondonópolis (MT); RDF: repolho – Brasília (DF).....37

Figura 16 - Plano representado pelas coordenadas 1 e 2 da análise de componentes principais a partir de distâncias genéticas (NEI, 1978) obtidas do marcador molecular SSR entre indivíduos de diferentes populações de *Bemisia tabaci*. A diferenciação entre as duas populações (Pop 1 e Pop 2) são relativas ao agrupamento observado em análise realizada no programa Structure. 40

Figura 17 - Plano representado pelas coordenadas 1 e 2 da análise de componentes principais a partir de distâncias genéticas (NEI, 1978) obtidas do marcador molecular SSR entre indivíduos de *Bemisia tabaci* ocorrendo em diferentes plantas hospedeiras..... 41

Figura 18 - Plano representado pelas coordenadas 1 e 2 da análise de componentes principais a partir de distâncias genéticas (NEI, 1978) obtidas do marcador molecular SSR entre indivíduos de *Bemisia tabaci* ocorrendo em lavouras de soja no Mato Grosso e em São Paulo. 42

Figura 19 - Plano representado pelas coordenadas 1 e 2 da análise de componentes principais a partir de distâncias genéticas (NEI, 1978) obtidas do marcador molecular SSR entre indivíduos de *Bemisia tabaci* ocorrendo em lavouras de batata em São Paulo, Minas Gerais e Bahia. 43

Figura 20 - Plano representado pelas coordenadas 1 e 2 da análise de componentes principais a partir de distâncias genéticas (NEI, 1978) obtidas do marcador molecular SSR entre indivíduos de *Bemisia tabaci* ocorrendo em plantações de repolho no Distrito Federal e na Flórida (EUA). 44

Figura 21 - Plano representado pelas coordenadas 1 e 2 da análise de componentes principais a partir de distâncias genéticas (NEI, 1978) obtidas do marcador molecular SSR entre indivíduos de *Bemisia tabaci* ocorrendo em plantações de diferentes regiões do Brasil [Nordeste (NE), Sudeste (SE)e Centro-oeste (CO)] e nos EUA (US)..... 45

Diversidade genética de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera:Aleyrodidae) em diferentes culturas e localidades brasileiras

RESUMO

Pertencente a um grupo de insetos denominados moscas-brancas, *Bemisia tabaci* (Genn.) apresenta grande capacidade de causar sérios prejuízos a diferentes culturas de expressão econômica. Por representar um complexo de muitos biótipos, a caracterização e diferenciação genética desses biótipos por meio de ferramentas moleculares ganhou crescente importância para a adoção de medidas de controle e manejo desse inseto. Assim, o presente estudo objetivou caracterizar, quantitativamente e estruturalmente, a diversidade genética de populações de *B. tabaci* de diversas culturas de importância econômica de diferentes localidades, por meio dos marcadores moleculares RAPD e SSR. Ao todo foram coletados indivíduos de oito populações, sendo três destas em batata (Monte Mor/SP; São Gotardo/MG e Mucugê/BA), duas em soja (Campinas/SP e Rondonópolis/MT), uma em feijão (Capão Bonito/SP) e uma em repolho (Brasília, DF). Também foi incorporada ao estudo uma população procedente da Flórida (EUA), ocorrendo em repolho, identificada como biótipo B por pesquisadores daquela localidade. As análises de RAPD, com cinco populações, indicaram 80,6% de locos polimórficos e média geral de similaridade genética, obtida pelo coeficiente de Jaccard, de 0,67. O número de alelos por loco SSR para as oito populações do estudo variou de 2 a 13 e o valor médio de F_{ST} foi 0,13 e significativo, que pode ser classificado como moderado. A população ocorrendo em feijão no Estado de São Paulo mostrou-se diferenciada das duas outras localizadas no mesmo Estado (batata e soja), indicando que algum fator, como o uso excessivo de inseticidas ou o próprio hospedeiro, pode estar atuando sobre esses indivíduos de forma a afetar suas frequências alélicas. Os indivíduos provenientes dos EUA apresentam grande diversidade e pouca estruturação, assim como as populações procedentes da batata (Monte Mor, Mucugê e São Gotardo). De forma geral foi observada a existência de importante divergência genética dentro e entre populações, tanto com o marcador SSR quanto para o RAPD, e esta se encontra estruturada em dois grupos principais em função das regiões geográficas de coleta: um referente ao Centro-oeste (CO) do país e o outro abrangendo as demais populações (Sudeste, Nordeste e EUA).

Palavras-chave*:* Biótipo B, Genética populacional, Mosca-branca, RAPD, SSR.

Genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) in different crops and brazilian localities

ABSTRACT

Belonging to a group of insects known as whiteflies, *Bemisia tabaci* (Genn.) has great ability to cause serious damage to different crops of economic expression. Since it represents a complex of many biotypes the characterization and genetic differentiation of these biotypes by molecular tools has gained increasing importance in the adoption of measures for control and management of this insect. The present study aimed to characterize, quantitatively and structurally, the genetic diversity of populations of *B. tabaci* from several economically important crops in different locations, by means of molecular markers and SSR. Altogether, individuals from eight populations were collected, three of these in potatoes (Monte Mor/SP; São Gotardo/MG and Mucugê/BA), two in soybeans (Campinas/SP and Rondonópolis/MT), one in beans (Capão Bonito/SP) and one in cabbage (Brasília, DF). A population occurring in cabbage from Florida (USA) and identified as biotype B by local researchers was also incorporated to the study. The RAPD analysis performed with five populations showed 80.6% of polymorphic loci and genetic similarity average of 0.67, as obtained by the Jaccard coefficient. The number of SSR alleles per locus for all eight studied populations ranged from 2 to 13 and the average value of F_{ST} was 0.13 and significant, which can be classified as moderate. The B. tabacci population occurring in beans in São Paulo showed to be different from the two other located in the same state, indicating that some factor, such as excessive use of insecticides or the host itself, may be operating on these individuals so as to affect their frequencies allele. Individuals from the U.S. (RUS) and potato (Monte Mor, Mucugê and São Gotardo) are diverse and related to the other populations. Important genetic diversity was observed within and among populations, with both SSR and RAPD markers, and this is structured into two main groups depending on the region of collection: one refers to the Midwest of the country and the other encompasses the remaining populations (Southeast, Northeast and USA.).

Key-words: Biotype B, Population Genetics, RAPD, Silverleaf Whitefly, SSR.

1 INTRODUÇÃO

Bemisia tabaci (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) integra um grupo de insetos denominados moscas-brancas, mundialmente conhecida por sua grande capacidade de causar sérios prejuízos às mais diversas culturas (MOUND & HALSEY, 1978). Tanto as ninfas quanto os insetos adultos desta praga se alimentam da seiva das plantas, podendo causar seu amarelecimento, manchamento e até a queda das folhas. A excreção de uma substância açucarada conhecida como ‘’honeydew’’ propicia a colonização da superfície das folhas por fungos, que podem afetar o desenvolvimento sadio da planta (BYRNE & BELLOWS, 1991). Além disso, *B. tabaci* é vetor de mais de 110 fitovírus, causando muitas vezes a perda total das safras (JONES, 2003).

Desde que se tornou uma praga na agricultura, este inseto foi protagonista de vários estudos genéticos, morfológicos e comportamentais, tanto no Brasil quanto no exterior. Os estudos genéticos ganharam destaque, uma vez que *B. tabaci* compreende um complexo de biótipos cuja caracterização e separação não é realizada pela taxonomia convencional por se apresentarem morfologicamente muito semelhantes. Atualmente, há registros de mais de 24 biótipos no mundo todo denominados por letras de A a T (BROWN et al., 1995; FROHLICH et al., 1999; PERRING, 2001). O real significado biológico desses biótipos ainda não é totalmente conhecido, muito embora se saiba que eles podem diferir em importantes características como em relação às plantas hospedeiras, sua capacidade de causar certas disfunções fisiológicas (como o prateamento das folhas de abóbora ou *squash silverleaf*) ou pela transmissão de vírus (HOROWITZ et al., 2003).

No Brasil, quando ocorreram surtos de infestações dessa praga, no começo dos anos 90, descobriu-se que o biótipo responsável era o B (LOURENÇÃO & NAGAI, 1994), e desde então, por meio de estudos genéticos, principalmente com marcadores moleculares RAPD-PCR (LIMA et al., 2000; LIMA et al., 2002), não se obteve nenhuma evidência de outros biótipos invasivos no país, mesmo com sua extensão continental e facilidade de entrada e saída de material vegetal que pudessem favorecer a entrada desses biótipos.

O biótipo Q, de origem vinculada à Península Ibérica (BEITIA et al., 1997), não era considerado uma praga de grande importância na região do Mediterrâneo. Porém, em alguns anos, passou a preocupar agricultores locais por alcançar altas densidades populacionais, ser

vetor de vírus (MOYA et al.,2001) e desenvolver resistência a pelo menos uma classe de inseticida normalmente utilizado no controle de mosca-branca (RAUCH & NAUEN, 2003). Na região sul da Espanha, o biótipo B foi deslocado pelo Q, o qual também foi recentemente reportado em novos e distantes países onde antes não existia, como a China (ZHANG et al., 2005), os Estados Unidos (BROWN et al., 2005), o México e a América Central (OSBOURNE, 2005).

Os vários marcadores utilizados até hoje em *B. tabaci* foram as alozimas (BROWN et al., 1995), os RAPD (Randon Amplified Polymorphic DNA) (GUIRAO et al., 1997; LIMA et al., 2002) e o AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (CERVERA et al., 2000), além de análises filogenéticas baseadas nos genes CO1 e ITS-1 (FROHLICH et al., 1999). Embora esses marcadores tenham sido utilizados com êxito para o entendimento e/ou a separação de biótipos dentro da espécie, pouco se sabe sobre a genética populacional desse inseto.

Mais recentemente, foram realizados alguns estudos com o marcador molecular SSR (Simple Sequence Repeats) ou microssatélite em *B. tabaci* (DE BARRO et al., 2003; DE BARRO, 2005; SIMÓN et al., 2007; TSAGKARAKOU & RODITAKIS, 2003), mais adequados para estudos populacionais de insetos, haja vista que são marcadores codominantes que permitem a detecção de eventos recentes de deriva genética (CORNUET & LUIKART, 1996).

Além da preocupação com a entrada de novos biótipos no país, há também a necessidade de entendimento da especialização deste inseto em culturas antes não intensamente atacadas, como é o caso da batata. Nesse hospedeiro, a ocorrência de *B. tabaci* era relativamente discreta, sem causar danos às plantas (LOURENÇÃO et al., 2003). Segundo esses autores, altas infestações em lavouras de batata são recentes no país, tendo sido constatados os primeiros surtos populacionais a partir de 2001.

Assim, o presente estudo teve por objetivo caracterizar, quantitativamente e estruturalmente, a diversidade genética de populações de *B. tabaci* de diversas culturas de importância econômica de diferentes localidades, em especial na cultura da batata, com o intuito de melhor compreender as relações genéticas entre elas, utilizando para esta finalidade tanto marcadores RAPD como microssatélites.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Bemisia tabaci*: Aspectos Biológicos

As moscas-brancas são insetos pertencentes à ordem Hemiptera, subordem Sternorrhyncha e família Aleyrodidae. As espécies mais conhecidas são *Trialeurodes vaporariorum* (West.) (‘greenhouse whitefly’ ou ‘glasshouse whitefly’) e *B. tabaci* (Genn.) (‘sweetpotato whitefly’), ambas com extensa distribuição geográfica e capacidade de causar sérios prejuízos às mais diversas culturas no mundo (MOUND & HALSEY, 1978).

Esse inseto de tamanho reduzido, medindo de 1 a 2 mm de comprimento, apresenta coloração amarelada e asas brancas (Figura 1 - 2). O macho, que tem tamanho inferior à fêmea, apresenta ciclo de vida mais curto (BUTLER et al., 1983; EICHELKRAUT & CARDONA, 1989; GERLING et al., 1986). Um fator que altera a longevidade de *B. tabaci* é a época do ano, já que, no verão, o tempo aproximado de vida das fêmeas é de uma a três semanas, enquanto que os machos vivem menos de uma semana; no inverno, os insetos vivem mais de dois meses (GERLING et al., 1986). Estudos sobre sua biologia mostraram que a fêmea pode colocar de 40 a 300 ovos durante sua vida, variável conforme a temperatura e a planta hospedeira (OLIVEIRA & SILVA, 1997).

Figura 1 – 2 *Bemisia tabaci* sobre a superfície de uma folha. 1. Detalhe de um indivíduo em meio aos ovos e às pilosidades da folha (Fonte: Avas Hamon). 2. Vários indivíduos da praga colonizando a superfície abaxial de uma folha (Fonte: Pioneer Sementes).

De maneira geral, esses insetos se reproduzem sexuadamente, muito embora possa ocorrer reprodução assexuada (partenogênese arrenótoca), que resulta em uma prole composta apenas de machos (BYRNE & BELLOWS, 1991). LYNCH & SIMMONS (1993) observaram que *B. tabaci* prefere folhas jovens das plantas para alimentação e oviposição, e, de acordo com BUTLER et al. (1983), em busca de proteção contra o vento e a consequente dessecação, as fêmeas ovipositam preferencialmente na face abaxial de folhas jovens que apresentam pilosidade moderada (EICHELKRAUT & CARDONA, 1989) e consequentemente alta disponibilidade de nutrientes (LENTEREN & NOLDUS, 1990).

Apresentando metamorfose incompleta (ovo, ninfa com quatro estádios e adulto), a fase de ovo a adulto pode variar entre 14 dias a 30ºC até 105 dias a 15ºC (Figura 3), sendo a faixa ótima compreendida entre 20 e 30ºC (WANG & TSAI, 1996). O ovo, de coloração amarela e formato de pera, é fixado por um pedicelo na superfície abaxial da folha da planta hospedeira. Após a eclosão, as ninfas se locomovem pela folha até um local adequado à sua fixação, período que pode variar de uma hora a alguns dias e, após se instalarem, penetram com seu aparelho bucal no floema da planta e permanecem sésseis até a fase adulta. (EICHELKRAUT & CARDONA, 1989).

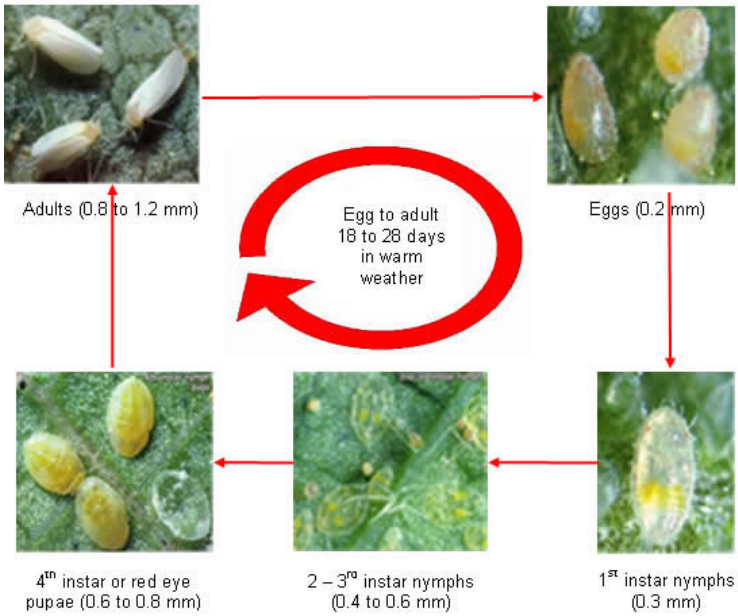

Figura 3 - Representação esquemática do ciclo de vida de *Bemisia tabaci*, de ovo a adulto. (Fonte: www.dpi.qld.gov.au)

2.2 Origem e Disseminação

A provável origem de *B. tabaci* está vinculada ao Oriente Médio ou Paquistão, tendo este último abundância dos predadores naturais desse inseto, o que lhe confere boa indicação para ser o centro de origem da espécie (BROWN et al., 1995). Sua disseminação para os outros continentes ocorreu provavelmente pelo transporte de material vegetal pelo homem, sendo atualmente considerada uma espécie cosmopolita (BROWN & BIRD, 1992).

O primeiro relato desta mosca-branca foi realizado por Gennadius em 1889 em plantas de tabaco, na Grécia, sendo primeiramente chamada de *Aleyrodes tabaci* (COCK, 1986; GENNADIUS, 1889). Devido a variações morfológicas no pupário do inseto, que ocorre em função da planta hospedeira na qual a ninfa se desenvolve, por cinquenta anos foram descritas 19 espécies de mosca-branca colonizando diferentes plantas em vários países no mundo. Porém, RUSSEL (1957) e, mais tarde, MOUND & HALSEY (1978) uniram grande parte destas supostas novas espécies em apenas uma: *Bemisia tabaci* (PERRING, 2001).

Na América do Norte, essa espécie foi observada pela primeira vez na Flórida, no ano de 1894, e em 1920, na Califórnia (FRANÇA et al., 1996). Posteriormente, de 1926 a 1981, houve relatos em diversas localidades do mundo, como praga esporádica e secundária, mas sempre tida como importante vetor de vírus nas regiões tropicais e subtropicais (BYRNE & BELLOWS, 1991; VILLAS BÔAS et al., 1997). A América Central passou a sofrer sérios ataques, principalmente em cultivos de algodão, a partir dos anos 60, (VILLAS BÔAS et al., 1997), e, no Brasil, o primeiro relato de *B. tabaci* foi realizado em 1923, sendo citada a ocorrência do inseto em baixos níveis de infestação na Bahia (BONDAR, 1928). Décadas mais tarde ocorreram surtos populacionais em algodoeiro, no norte do Paraná (1968), e em culturas de soja, algodão e feijão no norte do Paraná e na região sul de São Paulo (COSTA et al., 1973). Após essas constatações, que se referiam provavelmente ao biótipo A (também conhecido como BR no Brasil), aumentos consideráveis em populações de mosca-branca se deram apenas no início dos anos 90, no Estado de São Paulo, quando foi observada pela primeira vez no país a presença do biótipo B (LOURENÇÃO & NAGAI, 1994), o qual foi confirmado pela Dra. Judith Brown, da Universidade do Arizona (EUA), a partir de espécimes de mosca-branca coletados em tomateiro no Distrito Federal (FRANÇA et al., 1996). Em 1991, foram verificados, na cidade de Holambra, surtos populacionais do inseto em diversas plantas ornamentais (principalmente crisântemo e bico-de-papagaio); em Paulínia, em 1992, em tomateiros, aboboreiras e plantas invasoras e, no

mesmo ano, em Artur Nogueira, em algodoeiro. No ano seguinte, no Distrito Federal, cultivos de tomate foram agressivamente atacados (FRANÇA et al., 1996). Foram verificadas também altas populações de *B. tabaci* biótipo B em cultivos de soja no Estado do Paraná, na região de Primeiro de Maio, na safra 1995/1996, causando prejuízos severos, quase que totais, à cultura (SOSA-GOMEZ et al., 1997). Posteriormente, a praga se disseminou pelas principais áreas agrícolas do país (FRANÇA et al., 1996; HAJI et al., 1996). Assim, em 1997/98, no município de Miguelópolis, SP, LOURENÇÃO et al. (1999) verificaram altas infestações do biótipo B em lavouras de soja, nas quais havia a presença quase que generalizada de fumagina nas folhas. No ano seguinte, em Balsas, no estado do Maranhão, também foram observadas infestações dessa mosca-branca em plantios comerciais de soja (LOURENÇÃO et al., 2001). Na Bahia, foram feitas inspeções em culturas de maracujá em Livramento de Nossa Senhora, onde se verificou a ocorrência de altas populações de mosca-branca colonizando o maracujazeiro e outras plantas daninhas (YUKI et al., 2002). Segundo OLIVEIRA (2001), de 1995 a 2001, o Brasil já acumulou perdas em torno de cinco bilhões de dólares, sendo as culturas mais afetadas as de tomate, feijão, algodão, melão, melancia, quiabo e repolho, em quase todas as áreas de agricultura do país (LIMA et al., 2000).

2.3 Plantas Hospedeiras

Classificado como um inseto polífago, *B. tabaci* biótipo B tem como plantas hospedeiras mais de 600 espécies vegetais, sendo que metade delas está vinculada a cinco famílias: Fabaceae, Asteraceae, Malvaceae, Solanaceae e Euphorbiaceae (OLIVEIRA, 2001), destacando-se: curcubitáceas (abóboras, melancia, melão, pepino e chuchu), solanáceas (tomate, beringela, batata, fumo e jiló), brássicas (brócolos, couve, couve-flor e repolho), leguminosas (feijão e soja), plantas da vegetação espontânea e ornamentais, segundo VILLAS BÔAS et al. (1997).

A ocorrência de mosca-branca em batata é conhecida há vários anos, mas suas populações sempre foram muito baixas, sem causar danos às plantas. Na literatura há referência de *Solanum tuberosum* como hospedeira de *B. tabaci* (MOUND & HALSEY, 1978), porém os textos básicos de entomologia não relacionam essa espécie de mosca-branca como praga da cultura no Brasil (GALLO et al., 2002). De fato, altas infestações do biótipo B de *B. tabaci* em lavouras de batata são recentes no país, tendo sido constatados os primeiros surtos populacionais a partir de 2001. Assim, a cultura ganhou um inseto – praga a mais, cujo controle contribui para aumentar os

custos de produção. Além de sua ação como praga, o inseto pode atuar como transmissor de *Tomato yellow vein streak virus* (TYVSV), geminivírus que infecta o tomateiro e que também pode infectar a batata, conforme demonstrado por SOUZA-DIAS et al.(1996), com o agravante desse vírus ser mantido na cultura pela batata-semente. A associação TYVSV-batata passou a ser bastante preocupante em virtude da instalação de plantações de tomate ao lado de lavouras de batata dentro de uma mesma propriedade ou mesmo em propriedades vizinhas, como ocorrido no Estado de São Paulo em anos recentes (LOURENÇÃO et al., 2003). Na região de Sumaré e em várias outras regiões do Estado de São Paulo, SOUZA-DIAS & SAWASAKI (2004) relataram que *B. tabaci* biótipo B tem transmitido o *Tomato yellow vein streak virus* (TYVSV) de tomatais infectados para plantas de batata.

No caso da soja (*Glycine max* L.), COSTA et al. (1973) atribuíram como uma das causas dos surtos de *B. tabaci* a expansão das áreas de cultivo dessa cultura, considerada excelente hospedeira. Em sequência, houve aumento na incidência de viroses associadas ao transmissor, principalmente o mosaico-dourado-do-feijoeiro. Embora não se conheça até o momento nenhum vírus de importância econômica para a cultura da soja que seja transmitido pela mosca-branca, a sua produtividade pode ser diminuída dependendo da população do inseto no campo, por seus danos diretos e indiretos.

Desde 1991, altas populações de mosca-branca têm sido observadas colonizando os três tipos de aboboreira mais cultivados, *Cucurbita pepo* L., *Curcubita maxima* Duch. ex Lam. e *Curcubita moschata* (Duch. ex Lam.) Duch. ex Poir (NAGAI et al., 1992). Desordens não patogênicas associadas ao biótipo B de *B. tabaci* foram relatadas nos Estados Unidos nessa cultura, como o prateamento das folhas (YOKOMI et al., 1990), fitotoxemia que, além de debilitar as plantas, resulta em clareamento das nervuras e despigmentação foliar associadas à presença de ninfas de mosca-branca em folhas sintomáticas (RAMOS et al., 1995). As ninfas desenvolvem-se na face inferior das folhas e, tanto elas quanto os adultos, alimentam-se do conteúdo do floema, competindo com o desenvolvimento das plantas. PARIS et al.(1993) evidenciaram que o prateamento-da-folha-da-aboboreira ocorria tanto no campo como em casa de vegetação, mas com intensidades diferentes, de maneira que existem cultivares mais sensíveis ao prateamento. Os sintomas aparecem três a cinco dias após a exposição da folha às ninfas (YOKOMI et al., 1990) e a partir de onze dias se exposta a adultos, sendo a densidade de insetos importante na resposta da planta (DE BARRO & KHAN, 2007).

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) tem especial importância para o Brasil, que se destaca entre os cinco países responsáveis por mais de 60% da produção mundial. *B. tabaci* é um dos responsáveis pela baixa produtividade nessa cultura, gerando prejuízos significativos em consequência da transmissão do vírus causador do mosaico-dourado-do-feijoeiro (Figura 4) (LOURENÇÃO & NAGAI 1994; YUKI et al. 1998). Justamente por atuar como vetor de vírus, o nível de dano econômico da mosca-branca não está relacionado aos prejuízos advindos da sua alimentação no feijoeiro, sendo que populações reduzidas podem causar perdas significativas na produção (COSTA 1965; DOURADO NETO & FANCELLI 2000). Entre as causas da alta incidência da mosca-branca, estão a expansão da área de plantio da soja, uma das hospedeiras preferenciais do inseto, a ampliação da época de semeadura e os cultivos sucessivos e escalonados do feijoeiro com o uso de pivô-central (VIEIRA et al., 1998).

Figura 4 - Plantas de feijoeiro apresentando sintomas do mosaico-dourado causado por vírus transmitido por *Bemisia tabaci*.

A mosca-branca também é uma das pragas causadoras de prejuízos à cultura do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L) em vários países (BUTLER Jr et al., 1991), sendo que seus danos vêm aumentando anualmente, em diferentes regiões produtoras do Brasil (ARAÚJO et al. 1998). Durante anos, *B. tabaci* foi considerada apenas uma praga ocasional do algodoeiro no Brasil. Com a introdução do biótipo B, no início da década de 90 (LOURENÇÃO & NAGAI 1994), e suas altas infestações ocorridas no verão (VALLE & LOURENÇÃO 2002), esse biótipo

passou a ser importante como praga do algodoeiro. Problemas associados à pegajosidade da fibra, devido à secreção do *honeydew* pelo inseto, incluem dificuldade no deslintamento, redução na eficiência do processo industrial, alteração da qualidade do produto final e baixa lucratividade (HEQUET & ABIDI 2002).

A cultura do melão (*Cucumis melo* L) também tem sofrido com ataques da praga e, segundo AZEVEDO & BLEICHER (2003), em alguns Estados brasileiros, o biótipo B de *B. tabaci* é considerado a praga mais importante dessa cultura. Além dos danos consequentes da alimentação e injeção de toxinas na planta e o aparecimento de fumagina devido à excreção do *honeydew* (SALES Jr et al.,2004), a transmissão do vírus *Watermelon chlorotic stunt vírus* (WCSV), que provoca o encarquilhamento devido às manchas aneladas nas folhas, pode prejudicar o desenvolvimento da cultura (COSTA & BROWN, 1990; SILVEIRA & ALBERT Jr, 1997).

2.4 *Bemisia tabaci* biótipo B

No Brasil, o biótipo preexistente, conhecido como A, tinha importância apenas como vetor de alguns tipos de fitovírus (COSTA, 1976). Com a introdução do biótipo B, no começo dos anos 90, o biótipo endêmico no país foi deslocado, sendo atualmente muito difícil detectar sua presença nas áreas agricultáveis.

O biótipo B está difundido mundialmente e apresenta como características principais, que o diferenciam do A: maior taxa de fecundidade, maior espectro de hospedeiros, níveis elevados de resistência a inseticidas (COSTA & BROWN, 1991), grande produção de *honeydew*, uma substância açucarada (composta pelos açúcares trealose, melose, sacarose, frutose e glicose) que atua de forma nociva sobre as plantas, propiciando o aparecimento de fungos oportunistas como a fumagina, do gênero *Capnodium*, afetando o processo de fotossíntese, com consequente redução na produção e qualidade dos frutos (OLIVEIRA et al., 2001; VALLE et al., 2002).

Além disso, este biótipo induz desordens fitotóxicas em algumas plantas, causadas pela sucção da seiva e introdução de substâncias tóxicas em seus hospedeiros (BEDFORD et al.,1994; BYRNE & BELLOWS, 1991; COHEN et al., 1992; COSTA & BROWN, 1991).

Essas desordens podem ser observadas de diversas formas como o amadurecimento irregular dos frutos em tomate (MAYNARD & CANTLIFFE, 1989) (Figura 5), que dificulta o reconhecimento do ponto de colheita e, por sua vez, gera um problema sério de qualidade para o

fruto destinado à industrialização, além de afetar também o consumo a fresco, uma vez que a polpa fica descolorida e sem gosto, assumindo um aspecto isoporizado. O branqueamento do caule e das veias da folhagem em brássicas e poinsétia, respectivamente, e o prateamento-das-folhas-de-aboboreiras (YOKOMI et al., 1990) (Figura 6) também são desordens consequentes da atividade sugadora do inseto. Recentemente foi relatado que outros dois biótipos de *B. tabaci* induziram o prateamento das folhas em aboboreiras: o biótipo Ms (DELATTE et al., 2005) e o biótipo Ug6 (SSERUWAGI et al., 2005); contudo, a distribuição atual deles se restringe a ilhas do Oceano Índico e à África.

Figura 5 - Fruto do tomateiro apresentando amadurecimento irregular decorrente de desordem fisiológica causada por *Bemisia tabaci* biótipo B. (Fonte: Universidade de Kentucky, EUA)

O biótipo B atua como vetor de sete grupos distintos de vírus (geminivírus, closterovírus, carlavírus, potyvírus, nepovírus, luterovírus e um vírus de partícula livre de DNA), segundo DUFFUS et al.(1987). Mandioca, feijão, soja, algodão, tabaco, tomate, pimenta, abóbora, melancia, alface, mamão e quiabo são conhecidamente afetados por um ou mais fitovírus transmitidos por *B. tabaci*, sendo os geminivírus, que infectam o tomate, o feijão e a mandioca, os mais disseminados e importantes no sentido de dano econômico (OLIVEIRA et al., 2001).

Figura 6 - Folha de planta de aboboreira apresentando sintomas de prateamento causados por *Bemisia tabaci* biótipo B. (Fonte: Universidade da Flórida, EUA)

2.5 Complexo de Espécies

A espécie *B. tabaci* possui alta variabilidade genética entre suas populações ao redor do mundo (BROWN 1994; BROWN et al. 1995; COSTA & BROWN 1991), o que levou à identificação de um complexo de biótipos (BEDFORD et al., 1994; PERRING, 2001). Essa classificação foi baseada em estudos que encontraram diferenças entre populações e suas capacidades de transmissão de vírus, mudanças de hospedeiros e habilidade para induzir respostas fitotóxicas em certas espécies de plantas (BEDFORD et al.,1994; COSTA & BROWN, 1991).

Atualmente, há registros de mais de 24 biótipos que são normalmente denominados por letras de A a T (BROWN et al., 1995; FROHLICH et al., 1999; PERRING, 2001). PERRING (2001), comparando informações obtidas de vários trabalhos relacionados à *B. tabaci*, que abrangeram estudos de cruzamentos (BEDFORD et al. 1994), morfologia (ROSELL et al., 1997) e marcadores moleculares (BROWN et al., 2000; DE BARRO et al., 2000; FROHLICH et al., 1999), separaram o complexo *Bemisia tabaci* em sete grupos, os quais podem representar apenas um ou dois biótipos, como é o caso do grupo Cosmopolita, representado pelo biótipo B, ou ainda reunir alguns biótipos de uma determinada região ou até continente, como é o caso do grupo Austrália e Novo Mundo, respectivamente.

Alguns destes biótipos estão intimamente relacionados ao seu hospedeiro, ou seja, parte

dessas populações apresenta indivíduos monófagos ou pelo menos oligófagos. Essa observação subsidia a noção de raças associadas ao hospedeiro (*host races*) para esta espécie, que significa que existem populações que, apesar de não apresentarem claramente diferenças morfológicas, apresentam diferenças quanto à sobrevivência e ao desenvolvimento em hospedeiros particulares (CLARIDGE et al., 1997). Um exemplo clássico é o caso da mandioca, que no Brasil não é colonizada por *B. tabaci* (COSTA & RUSSELL 1975), porém, na África, sofre severos danos pelas populações de *B. tabaci* lá existentes, as quais apresentam histórico de monofagia para essa euforbiácea, inclusive com transmissão de vírus (CHANT, 1958). BIRD (1957) encontrou duas populações coexistindo em Porto Rico que apresentavam diferenças quanto ao espectro de hospedeiros, sendo uma delas estritamente relacionada a *Jatropha gossypifolia* L., uma planta daninha, enquanto a outra população colonizava várias outras espécies de planta ao mesmo tempo (PERRING, 2001).

Apesar destas observações, DE BARRO (2005), após uma análise de vários exemplares de *B. tabaci* oriundos da região da Ásia-Pacífico de 53 localidades, utilizando marcadores moleculares microssatélites, sugere que esta espécie apresenta uma divergência geográfica (alopátrica), sendo a estruturação por planta hospedeira um fator adicional e não crucial para as populações.

A identificação dos vários biótipos desta praga é de suma importância para seu manejo adequado, sobretudo em relação às culturas hospedeiras. Normalmente, as espécies de mosca-branca são identificadas pela taxonomia convencional ou clássica, a qual se mostrou ineficaz para a separação destes biótipos, uma vez que dentro do complexo *B. tabaci* as estruturas morfológicas são muito semelhantes. Nesse sentido, técnicas moleculares foram desenvolvidas e estão sendo utilizadas no mundo todo, facilitando a separação dos biótipos de forma rápida e segura, por meio de izoenzimas, reações específicas de fitotoxidade e marcadores moleculares (PERRING, 2001).

Fatores genéticos como arrenotoquia (que favorece a eliminação de genes recessivos desfavoráveis nos machos haplóides) e atividades humanas que proporcionam grande quantidade de alimentação homogênea e estável (monoculturas, muito disseminadas no Brasil), em associação com a pressão de seleção do ambiente pelo uso indiscriminado de inseticidas, podem contribuir para uma rápida especialização e posterior especiação das moscas-brancas (GERLING, 2002). O conhecimento sobre variação genética entre as populações de mosca-branca é

necessário para um controle e manejo eficientes (LIMA et al., 2002).

2.6 Marcadores Moleculares na Genética de Populações

Marcadores moleculares permitem gerar uma grande quantidade de informações sobre a diversidade genética e relacionamentos filogenéticos dos indivíduos analisados. O grande número de marcadores moleculares disponível permite uma amostragem extensiva dos genomas de interesse em nível de DNA, sem influência do ambiente. Na maioria dos modelos utilizados, cada marcador é analisado como sendo um caráter fenotípico distinto e independente dos demais. A interpretação deste tipo de dado é feita de maneira simples: bandas em comum entre genótipos representam similaridades genéticas, enquanto que bandas não comuns representam diferenças genéticas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). A premissa feita em uma análise de distância genética baseada em marcadores é de que segmentos de mesmo tamanho na eletroforese são homólogos em relação as sequências flanqueadas pelos *primers*.

O aparecimento e uso de marcadores moleculares foi a principal ferramenta que alavancou o estudo da genética de populações, sendo que atualmente estão sendo muito utilizados no reconhecimento de biótipos da mosca-branca *B. tabaci,* possibilitando a caracterização da estrutura genética entre e dentro de populações.

Do ponto de vista genético, uma população pode ser definida como um conjunto de indivíduos de uma mesma espécie que compartilham os mesmos genes por meio da reprodução (FALCONER & MACKAY, 1989). Os parâmetros descritivos para avaliar a estrutura genética de uma população são as frequências alélicas e genotípicas, que se referem, respectivamente, à quantidade observada de um determinado alelo frente ao total de alelos da população e a quantidade observada de indivíduos com um determinado genótipo frente ao total de indivíduos da população. A heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) e a diversidade genética são as medidas da variabilidade genética da população que permitem identificar os alelos e, consequentemente, o número de indivíduos heterozigotos, bem como a quantidade de indivíduos homozigotos diferentes (WEIR, 1996).

A alteração genética de uma população pode ser avaliada pela mudança nas suas frequências gênicas, o que torna a estimativa da frequência de heterozigotos fundamental nos estudos evolutivos (NEI, 1978). Um determinado alelo, em um grupo de indivíduos diploides, tem como frequência o número de indivíduos homozigóticos para o alelo, mais a metade do

número dos heterozigóticos, dividido pelo número total dos indivíduos no grupo. Conforme WEIR (1996), conhecer a frequência dos heterozigotos é importante na medida em que cada heterozigoto carrega alelos distintos, demonstrando a existência de variação genética na população. Forças evolutivas tais como mutação, migração, seleção e deriva genética atuam dentro do contexto de cada espécie, influenciando a estrutura genética da população, ou seja, interferindo na distribuição heterogênea (não aleatória) dos alelos e genótipos no espaço e tempo (HAMRICK, 1982). A migração ou fluxo gênico atua promovendo homogeneidade genética, enquanto que mutação, deriva genética e seleção atuam favorecendo adaptações às condições ambientais locais que podem levar à diferenciação genética de populações (FUTUYMA, 1998).

O sistema pelo qual a espécie se reproduz influencia diretamente suas frequências alélica e genotípica. Uma população de tamanho infinito, que pratica cruzamentos ao acaso, está em equilíbrio de Hardy-Weinberg quando suas frequências alélicas e genotípicas não se alteram nas sucessivas gerações e há total ausência de migração, mutação, seleção e deriva genética. Através deste princípio é possível o cálculo da frequência dos genótipos a partir das frequências dos alelos (FUTUYMA, 1993).

Análises feitas por RAPD mostraram-se eficazes no reconhecimento de variabilidade dentro do complexo *B. tabaci*, pois, além de ser um método no qual se pode preservar o material em álcool, tem um custo baixo e é relativamente simples e rápido, no qual se pode utilizar cada indivíduo em qualquer estádio de desenvolvimento (DE BARRO & DRIVER, 1997). É amplamente utilizado com sucesso para fins de marcador taxonômico e genético, como já descrito por WELSH & MCCLELLAND (1990). Embora alguns modelos estatísticos tenham sido desenvolvidos, a perda de informação genotípica pelo marcador, advinda da não identificação do genótipo heterozigótico (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996), limita sua utilização, pois as estimativas de parâmetros populacionais muitas vezes podem não ser reais (EXCOFFIER et al., 1992; LYNCH & MILLIGAN, 1994).

Marcadores moleculares microssatélites ou Simple Sequence Repeats (SSR) são repetições de pequenas sequências de um a seis nucleotídeos adjacentes repetidos lado a lado, sendo encontrados amplamente distribuídos pelo genoma da maior parte dos eucariotos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Os marcadores SSR têm sido amplamente utilizados em estudos de diversidade genética de populações devido à robustez, confiabilidade, praticidade operacional e por serem marcadores mais informativos geneticamente do que os dominantes,

como o RAPD.

De acordo com SUGANUMA & CIAMPI (2001), os marcadores SSRs apresentam características altamente desejáveis: são codominantes, ou seja, ambos os alelos de um mesmo indivíduo diploide heterozigoto são visualizados no gel, multialélicos e obtidos via PCR, o que facilita sua obtenção mesmo com poucas quantidades de DNA. Uma vez desenvolvidos os iniciadores utilizados para amplificar tais regiões do genoma, estes apresentam a vantagem de possibilitarem sistema multiplex, permitindo avaliar rapidamente grande número de indivíduos para um grande número de locos em pouco tempo. No caso de *B. tabaci*, alguns marcadores microssatélites foram desenvolvidos para a espécie por DE BARRO et al. (2003) e TSAGKARAKOU & RODITAKIS (2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos no Centro Experimental da Fazenda Santa Elisa, Instituto Agronômico de Campinas (IAC), no Centro de Pesquisa de Fitossanidade e no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais.

3.1 Locais de Coleta

Populações de *B. tabaci* de sete localidades do Brasil (Figura 7) e uma dos Estados Unidos foram analisadas. Suas respectivas localizações, plantas hospedeiras, número de indivíduos por população e códigos estão listados na tabela 1. Os insetos utilizados para este estudo foram coletados vivos em campo, sendo imediatamente armazenados em álcool 92% e mantidos no refrigerador até sua utilização.

A população de mosca-branca dos EUA foi cedida pelo Dr. Phil Stansly e é proveniente da criação controlada de *B. tabaci* da Universidade da Flórida (Institute of Food and Agricultural Sciences - Southwest Florida Research and Education Center), caracterizada como biótipo B.

Tabela 1 - Local de coleta, posição geográfica, altitude, planta hospedeira, número de indivíduos utilizados para as análises por RAPD e SSR e código das populações de *Bemisia tabaci* coletadas para este estudo.

Local de Coleta	Posição Geográfica	Altitude (metros)	Planta Hospedeira	N RAPD	N SSR	Código	Data de Coleta
Campinas, SP	22°54'20"S 47°03'39"O	854	Soja	13	20	SSP	out.07
Monte Mor, SP	22°56'48"S 47°18'57"O	560	Batata	13	20	BSP	ago.08
São Gotardo, MG	19°18'40"S 46°02'56"O	1055	Batata	-	20	BMG	mar.08
Immokalee, FL (EUA)	26°51'24"N 81°38'14"O	10	Repolho	-	20	RUS	nov.09
Mucugê, BA	13°00'19"S 41°22'15"O	983	Batata	-	11	BBA	out.08
Capão Bonito, SP	24°00'21"S 48°20'58"O	705	Feijão	-	20	FSP	abr.09
Rondonópolis, MT	16°28'15"S 54°38'08"O	227	Soja	13	15	SMT	set.07
Rondonópolis, MT	16°28'15"S 54°38'08"O	227	Algodão	11	-	AMT	set.07
Brasília, DF	15°46'47"S 47°55'47"O	1171	Repolho	10	15	RDF	out.07

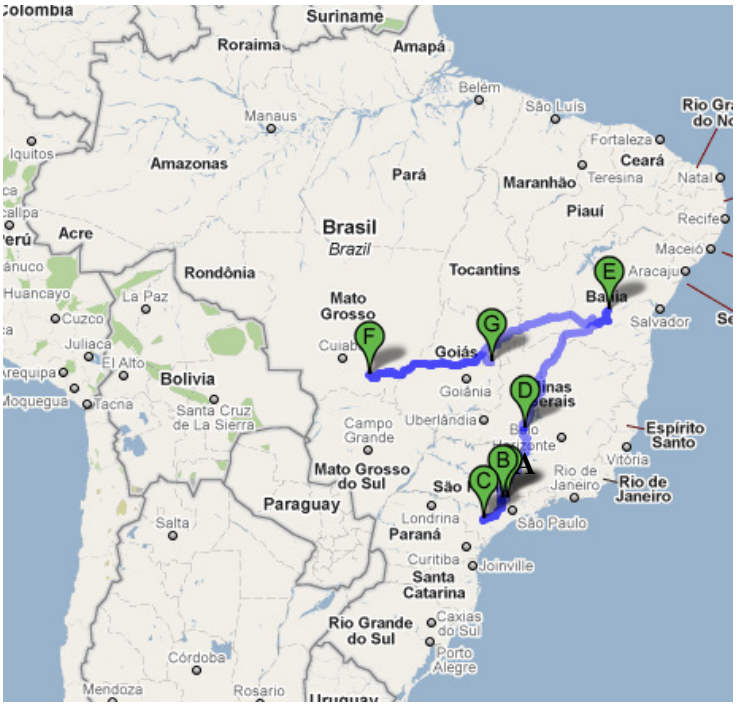

Figura 7 - Mapa do Brasil com os locais de coleta das populações de *Bemisia tabaci*. Letra A no mapa refere-se à cidade de Campinas, SP; letra B, a Monte Mor, SP; letra C, a Capão Bonito, SP; letra D, a São Gotardo, MG; letra E, a Mucugê, BA; letra F, à cidade de Rondonópolis, MT e letra G, a Brasília, DF. (Fonte: Google Maps).

3.2 Sexagem dos Insetos

A sexagem dos insetos foi realizada em cada população, pois a utilização das fêmeas de *B. tabaci* nas análises moleculares é de extrema importância, uma vez que estas são diploides e os machos haploides, oriundos de ovos não fertilizados (BYRNE & BELLOWS, 1991), o que aumenta a informação genética que pode ser obtida destes. O reconhecimento dos machos e das fêmeas foi feito com base nas diferenças anatômicas do abdômen do inseto, que na fêmea se apresenta arredondado e no macho em formato de "pinça" em sua porção final, além da diferença de tamanho entre os dois, sendo a fêmea maior (SOUZA & VENDRAMIM, 2000) (Figura 8).

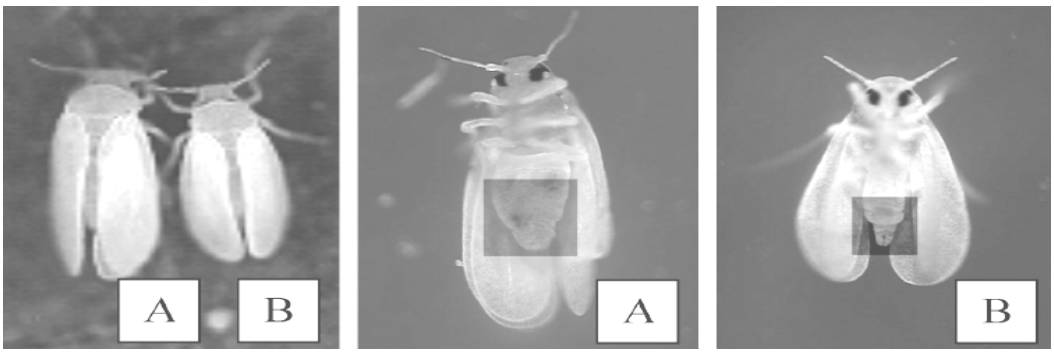

Figura 8 - Diferenças morfológicas entre representantes feminino (A) e masculino (B) de *Bemisia tabaci*, com destaque para o tamanho do inseto e formato do abdômen (Fonte: SOUZA & VENDRAMIM, 2000).

3.3 Teste de Prateamento da Folha de Aboboreira

A desordem fisiológica conhecida como prateamento-da-folha-de-aboboreira é resultado da intensa atividade de alimentação das ninfas (BYRNE & BELLOWS, 1991) e/ou de adultos de *B. tabaci* biótipo B em plantas de aboboreiras (PERRING, 2001). Para a população de *B. tabaci* de Campinas, identificada previamente como biótipo B, foi realizado um teste de prateamento da folha de aboboreira para confirmar a identificação, uma vez que este biótipo induz a desordem fisiológica descrita (BROWN et al. 1995). Para tanto, a infestação foi feita com a liberação de adultos do inseto criados em soja, em dois vasos contendo cada um uma planta de abóbora (*Cucurbita pepo* cv. Styria) que apresentava a primeira folha verdadeira completamente

desenvolvida. Cada planta foi coberta por gaiola plástica, com tampa telada, para evitar a fuga dos insetos. Um terceiro vaso, contendo uma muda de aboboreira, foi mantido protegido também por gaiola, sem infestação por *B. tabaci*, servindo como controle.

3.4 Obtenção do DNA

Para a caracterização e estudo da estrutura genética populacional de *B. tabaci*, a extração do DNA foi realizada em uma etapa, seguindo protocolo descrito por ALJANABI et al. (1998) e modificado por LIMA et al.(2002).

Amostras de cada indivíduo fêmea adulto (de 11 a 20 indivíduos por população) foram macerados em tubos de microcentífuga de 1,5 ml contendo 60 µL de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1mM, Triton X-100 0,3%, proteinase K 60 µg/ml) e incubados a 65º C por 20 minutos. Após isso, o homogeneizado foi incubado a 95º por sete minutos (para a inativação da proteinase K) e congelado a – 20º C.

Não foi necessária a quantificação do DNA, sendo adotada a concentração de 10-15 ηg de DNA para cada 4µL do homogeneizado.

3.5 RAPD-PCR

Previamente à análise de populações de *B. tabaci* pelo marcador molecular SSR, foi realizado um estudo com o marcador RAPD. Para tanto foram analisadas cinco populações do inseto (Tabela 1), sendo que quatro delas [populações coletadas em soja e algodão em Rondonópolis (MT), de soja em Campinas (SP); em repolho em Brasília (DF) e em batata na cidade de Monte Mor (SP)] também foram utilizadas no estudo com os marcadores microssatélites.

Para a reação de PCR, o volume total da reação foi de 15µl, com as seguintes concentrações: 1x Buffer PCR; 1,5mM MgCl2; 200µM dNTP; 1U Taq DNA polimerase, 0,4µM do iniciador e 10 a 15 ηg de DNA. As amplificações RAPD foram feitas com 13 iniciadores, que foram: OPA 2, OPA 4, OPA 10, OPK 10, OPK 11, OPH 07, OPH 15, OPH18 ,OPC-04, OPAC 06, OPAC 08, OPJ 05 e OPO 01 (Operon Technologies). A amplificação foi feita em um termociclador PTC-200, programado para um ciclo de três minutos a 94º C, 45 ciclos de um minuto a 93º C, um minuto a 35º C, dois minutos a 72º C e um ciclo final de cinco minutos a 72ºC. Em continuidade, a análise por eletroforese foi feita num gel de agarose 1,4% e com

tampão de corrida Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5X. A coloração do gel foi feita com brometo de etídio, sendo, em seguida, fotografado contra luz UV.

3.6 SSR-PCR

Para as análises referentes a este marcador molecular, foram utilizadas oito populações de *B. tabaci*. Sendo duas coletadas em plantas de soja na cidade de Campinas e Rondonópolis de códigos SSP e SMT, respectivamente; três coletadas na cultura da batata em Monte Mor, Mucugê e São Gotardo, de códigos BSP, BBA e BMG; duas outras populações em repolho em Brasília e nos EUA, de códigos RDF e RUS; e uma população coletada em plantas de feijão em Capão Bonito (FSP). O maior número de populações utilizadas para as análises por SSR foi devido à época de coleta de cada uma delas, sendo que quando foram gerados os dados por RAPD ainda não haviam sido coletados indivíduos de algumas populações.

Inicialmente foram tomados 13 locos SSR descritos em literatura. E, em paralelo, foram desenvolvidos novos locos SSR, segundo protocolo descrito por BILLOTTE et al. (1999), cuja representação esquemática do procedimento adotado encontra-se na figura 9.

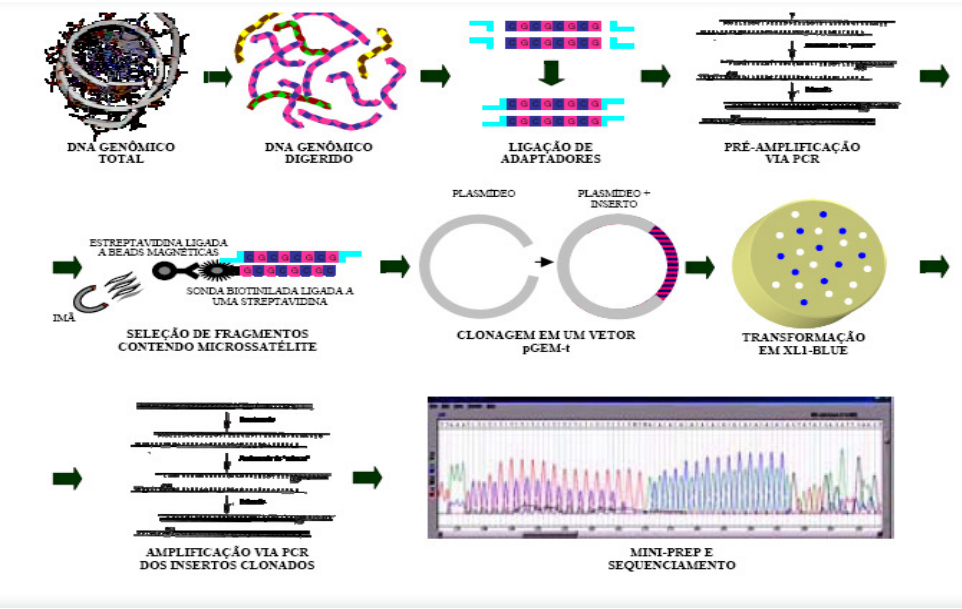

Figura 9 - Esquema para representação dos procedimentos adotados na construção da biblioteca enriquecida por microssatélites (Fonte: NUCCI, 2007).

Tabela 2 - Locos microssatélites utilizados em *Bemisia tabaci* com seus respectivos motivos, temperatura de reassociação, concentração de $MgCl_2$, amplitudes alélicas, número de alelos e número de acesso no Genbank.

Loco	Motivo	Referência	Ta (°C)	$MgCl_2$	Tamanho	N	GenBank
BT-e49	$(TTG)_{12}(TTC)_{11}$	TSAGKARAKOU et al.,2007	64	4,0mM	304–368	10	DQ365855
BTb-103	$(AC)_8(TC)_3$	TSAGKARAKOU & RODITAKIS, 2003	50	4,0mM	140-142	2	AY183679
BT-4	$(GT)_3(CA)_8$	TSAGKARAKOU & RODITAKIS, 2003	60	1,5mM	279-305	9	AY183673
BEM37	$(GCT)_4(GTT)_2$	DE BARRO et al.,2003	55	4,0mM	72-87	6	AY145464
BEM15	$(CAA)_6(CAG)_4(CAA)_4$	DE BARRO et al.,2003	50	1,5mM	142-262	21	AY145456
MB02	$(CT)_{16}$	não publicado	55	1,5mM	195-227	-	GF109947
MB04	$(TG)_5$	não publicado	60	2,0mM	120-155	-	GF109949
MB05	$(AC)_8$	não publicado	60	2,0mM	210-251	-	GF109950

N: número de alelos; Ta (°C): temperatura de reassociação.

As reações de PCR para amplificação dos locos microssatélites dos 141 indivíduos avaliados seguiram um modelo básico, em um volume final de 20 µL, contendo de 10 a 15 ηg do DNA; 0,4µM do *primer* direto marcado com fluorocromo e do *primer* reverso; 0,2 mM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfato (dNTP); solução tampão de Buffer 1 X (50 mM de KCl; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,8); 1 U de *Taq* DNA polimerase e 1,5; 2,0 ou 4mM de $MgCl_2$ (vide especificações na tabela 2).

As amplificações dos locos seguiram a mesma ciclagem em um termociclador PTC200 (MJ Research, Inc.) programado para iniciar com 5 minutos a 94ºC para uma desnaturação inicial, seguido por 30 ciclos com 1 minuto de desnaturação a 94ºC, 1 minuto com temperatura variando de 50 a 64 ºC dependendo do *primer* utilizado (anelamento) e 1 minuto de extensão a 72ºC, finalizando com 8 minutos a 72ºC para extensão final. As temperaturas de anelamento adotadas foram as mesmas preconizadas na tabela 2.

Os produtos de amplificação foram separados sob condições desnaturantes em gel 5% de

poliacrilamida contendo 8 M de ureia e 1 X TBE (Tris-borato EDTA) em sequenciador automático (ABI 377) por cerca de duas horas e trinta minutos a 70 Watts de potência. O equipamento funciona captando os sinais emitidos pela incidência do raio laser sobre os diferentes fluorocromos presentes nos *primers*, sendo estes convertidos em sinais na forma de eletroferograma. Por meio dos programas computacionais GeneScan® Analyses software versão 2.1.1 (ABPEC, Foster City, CA) e Genotyper® software, 43 versão 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) foram realizadas as análises posteriores.

3.7 Análises Estatísticas dos Dados

No caso dos marcadores RAPD, os produtos amplificados foram codificados como presentes (1) ou ausentes (0) para cada indivíduo analisado e os dados apresentados numa matriz de dupla entrada, indivíduos x bandas. A partir dessa matriz foi calculado o índice de concordância de Jaccard (SNEATH & SOKAL, 1973) e a estrutura genética do material do estudo revelada pelo dendrograma, obtido pelo método de agregação UPGMA. A diversidade genética entre e dentre os indivíduos procedentes das diferentes culturas e locais de coleta foi estimada pelo índice de Shannon (Ho). Também foi realizada a análise de variância dos dados moleculares (AMOVA) (EXCOFFIER et al 1992), que revela a partição da variação genética total entre e dentro das populações de estudo; para tanto foi utilizado o software *Arlequin* versão 3.1.

Para os SSR, as frequências gênicas ou alélicas e genotípicas em cada loco foram obtidas a partir da leitura dos dados pelo sequenciador ABI 377. Essas frequências foram submetidas a um teste de aderência (teste exato de Fisher) às proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg, conforme definido por WEIR (1996), utilizando o programa GENEPOP versão 2.0 (RAYMOND & ROUSSET, 1995). O teste exato de Fisher foi feito por meio do método da Cadeia de Markov utilizando 20 *batches* com 5000 permutações por *batch*.

A diversidade genética e as estatísticas F foram estimadas admitindo modelo aleatório, de acordo com WEIR (1996), em que as populações amostradas são consideradas como representativas da espécie e com uma história evolutiva comum. As frequências alélicas, o número de alelos por loco (*A*), a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) e as estatísticas *F* de Wright (F_{IS}, F_{ST} e F_{IT}), foram estimadas utilizando o programa GENETIX versão 4.05 (BELKHIR et al., 1996-2004).

O programa Structure (PRITCHARD et al., 2000), baseado em estatística bayesiana, foi utilizado alternativamente para inferir o número de grupos (k). Foram realizadas dez corridas para cada valor de K, 50.000 "burn-ins" e 500.000 simulações de Monte Carlo e de Cadeias de Markov (MCMC). Para definição do K mais provável em relação aos propostos foram utilizados os critérios propostos por PRITCHARD & WEN (2004) e também o critério proposto por EVANO et al. (2005).

A estruturação da variabilidade foi visualizada através de dendrograma construído pela matriz de distâncias genéticas de NEI (1978) e pelo critério de agrupamento UPGMA, sendo utilizado para isso o programa NTSYS (ROHLF, 1989), com a estabilidade dos agrupamentos testada através de 10.000 reamostragens *bootstrap* com auxílio do software BooD (COELHO, 2001). A análise de componentes principais (ACP), que é um método estatístico essencialmente descritivo, foi inicialmente proposta por K. Pearson em 1901 (MORRISON, 1976), tendo como objetivo apresentar em uma forma gráfica o máximo de informação contida em uma matriz de dados, para visualização da proximidade entre os indivíduos e os vínculos entre as variáveis. Por sua vez, as variáveis devem caracterizar da melhor forma possível os fenômenos que se pretende estudar, ou seja, simplificar os dados pela redução do número de variáveis (DROESBEKE & FINE, 1995; MANLY, 1986). No caso, a variável foi a distância genética de NEI (1978), calculada pelo programa NTSYS, sendo a construção dos gráficos realizada no programa STATISTICA. Foram feitos agrupamentos por população, por plantas hospedeiras em geral e separadamente e por localização geográfica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste de Prateamento da Folha de Aboboreira

As plantas de aboboreira submetidas à infestação por *B. tabaci* apresentaram os sintomas de prateamento das folhas, dez dias após o contato do inseto com a planta. A figura 10-11 ilustra o sintoma do prateamento observado, em contraposição com as folhas de coloração ao prateado das plantas controle (não infestadas). Portanto, para as análises de diversidade por meio de marcadores moleculares, a população proveniente da cultura de soja de Campinas (SSP) serviu de referência como biótipo B. Deve ser destacado que essa população vem sendo mantida há vários anos pelo Centro de Fitossanidade do IAC e foi inicialmente identificada pela Dra. Judith K.

Brown, Universidade do Arizona, EUA, como pertencente a esse biótipo.

Durante a coleta da população de Monte Mor (SP), de código BSP, foi constatada a presença de plantas adultas de aboboreiras na bordadura do campo de batata infestadas por moscas brancas do local e apresentando sintomas acentuados de prateamento das folhas. Dessa forma, mesmo que não experimentalmente, deduzimos que os insetos daquele local eram pertencentes ao biótipo B.

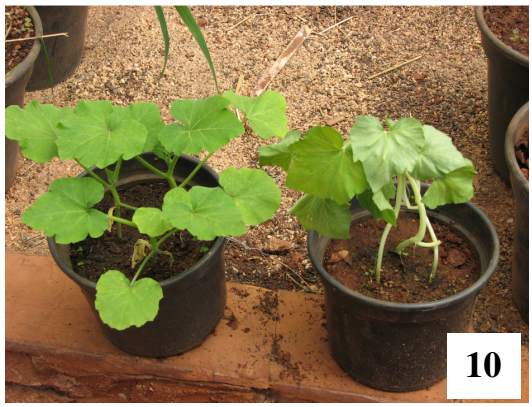

Figura 10-11 - Plantas de aboboreiras. 10. Planta da esquerda refere-se ao controle (não infectada) e planta da direita infectada e com sintoma (prateamento das folhas). 11. Detalhe da planta infectada.

4.2 RAPD-PCR

A diversidade genética das populações SMT, AMT, BSP, RDF, SSP de *Bemisia tabaci* utilizadas na presente dissertação foram inicialmente analisadas com o marcador molecular RAPD, o artigo encontra-se no Anexo I desse documento (FONTES et al., 2010).

As amplificações RAPD foram feitas com 13 *primers* e produziram um total de 71 *loci*, dos quais 80,6% apresentaram-se polimórficos. O número médio de bandas polimórficas gerado foi de 4,5. O tamanho das bandas amplificadas variou de 300 a 1.300 pb. Os *primers* que forneceram maior e menor número de *loci* totais e polimórficos foram OPO 01 e OPAC 06 com sete bandas e OPH-18, sendo que, de suas três bandas totais amplificadas, duas apresentaram

polimorfismo de presença e ausência.

A matriz de dados binários foi base para o cálculo do índice de similaridade genética (Jaccard) entre todos os 60 indivíduos do estudo. O valor médio de similaridade encontrado entre todas as comparações foi de 0,67, inferior ao encontrado por LIMA et al. (2002) que, entre 109 indivíduos de biótipo B, obtiveram similaridade média de 0,73, utilizando cinco *primers* RAPD, enquanto que em nosso estudo foram empregados 13 *primers* do mesmo marcador. Os valores médios de similaridade encontrados dentro de populações foram de 0,75 e 0,72 para batata (BSP) e soja (SMT), e de 0,76; 0,80 e 0,84 para as populações em soja (SSP), algodão (AMT) e repolho (RDF), respectivamente.

A partir dos dados do índice de similaridade de Jaccard obtidos para todos os indivíduos, foi calculada a média desses valores dentro e entre populações. Essa média foi utilizada para a construção de um dendrograma (UPGMA) (Figura 12), onde se observa que a estrutura genética formada é explicada, principalmente, pelos locais de procedência das amostras do estudo.

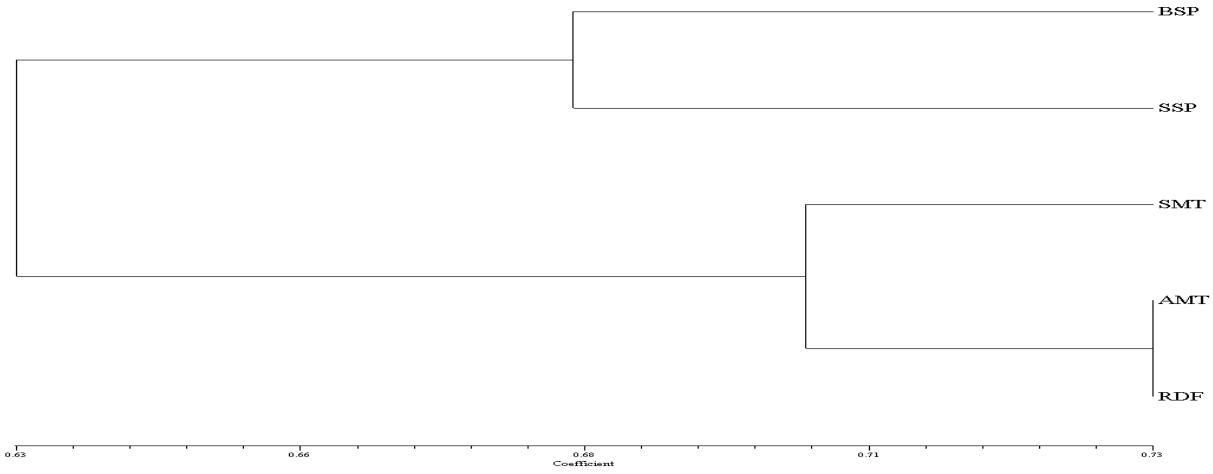

Figura 12 - Dendrograma representando a diversidade genética de populações de *Bemisia tabaci* ocorrendo em diferentes locais e culturas no Brasil, obtido a partir da média do índice de similaridade de Jaccard. SSP: soja – Campinas (SP); BSP: batata – Monte Mor (SP); SMT: soja – Rondonópolis (MT); AMT: algodão – Rondonópolis (MT); RDF: repolho – Brasília (DF).

O resultado da AMOVA revelou que uma porção considerável da variação genética encontra-se entre as populações (21%) e que a maior porcentagem de variação observada no

material de estudo ocorre dentro das próprias populações (79%). O índice de diversidade de Shannon (Ho), que diz respeito à variabilidade intrapopulacional, revelou os valores máximos e mínimos para as populações SMT (7,48) e RDF (5,36).

Os resultados obtidos demonstraram a variabilidade intra e interpopulacional existente em *B. tabaci* nas regiões e culturas amostradas no estudo, à semelhança do observado por outros autores (LIMA et al 2002). Uma das hipóteses para entender a estrutura genética baseada nas regiões geográficas de coleta pode ser atribuída ao hábito migratório do inseto, que, por sua vez, é consequência de fatores como a deterioração da cultura atacada e/ou a direção do vento, o que os faz migrar para outros campos de cultivos (VILLAS BÔAS et al. 1997). Segundo BYRNE (1999), o maior relato de voo a longa distância por *B. tabaci* foi de 7 km, de maneira passiva, numa corrente de ar. Voos desse tipo facilitam a migração de populações para locais distantes e a consequente colonização de várias outras culturas; assim, pode ocorrer fluxo gênico entre as populações, mesmo que elas não estejam tão próximas entre si. Esse parece ser o caso de AMT/SMT e RDF, em que, apesar da distância existente entre Rondonópolis e Distrito Federal, a facilidade de migração do inseto entre esses dois locais provavelmente é maior que dessa região para Campinas, uma vez que o Centro-oeste é de geografia plana, sem obstáculos que possam inibir tal migração, o que já não ocorre em direção ao Estado de São Paulo, pois a Serra da Mantiqueira pode servir de barreira, atuando como fator de divisão dessas populações. Outra explicação importante para essa clusterização heterogênea pode ser as diferenças entre fatores nutricionais e comportamentais (LIMA et al. 2002), ou ainda o modo de introdução do biótipo B, que pode ter se dado de forma dispersa, ao invés de uma única população fundadora (LOURENÇÃO & NAGAI 1994).

Mesmo com a possível ocorrência de migração entre insetos de culturas e regiões próximas, como discutido acima, observou-se que a similaridade média intrapopulacional encontrada foi mais elevada do que a média geral. De acordo com DE BARRO (2005), isso pode se dar em razão do aumento de endocruzamentos na população, o que pode levar a uma diminuição da variabilidade genética, gerando indivíduos geneticamente mais parecidos.

Um dos objetivos do estudo foi caracterizar insetos de *B. tabaci* ocorrendo em lavouras antes não atacadas, como a cultura da batata, com suspeita de não pertencerem ao biótipo B. Os indivíduos coletados na cultura da batata, no município de Monte Mor (SP), foram em grande parte agrupados com a população SSP. Em outras palavras, foi observado que a população BSP é

geneticamente próxima de SSP e, nesse caso, seria mais provável supor que os insetos ocorrendo na cultura da batata seriam procedentes da cultura da soja. Considerando que a ocorrência da mosca-branca na cultura da batata é relativamente recente, era de se esperar menor divergência genética entre os insetos dessa cultura, o que não ocorreu. Por outro lado, a evidência de alta divergência genética na população BSP poderia ser explicada pela ausência de estrutura genética na população de *B. tabaci* ocorrendo na cultura da soja do Estado de São Paulo. Nesse caso, os indivíduos da cultura da soja que, eventualmente, teriam migrado para a cultura da batata, teriam diversidade alélica relativamente alta em relação à população original.

4.3 SSR-PCR

4.3.1 Seleção dos locos encontrados em literatura

Em relação aos locos microssatélites descritos em literatura para *B. tabaci*, treze foram escolhidos com base no grau de polimorfismo (número de alelos por loco) e tamanho dos fragmentos gerados relacionados pelos autores. Assim, os *primers* foram sintetizados e testados em relação à amplificação dos locos de interesse e grau de polimorfismo no material biológico do estudo. Os testes iniciais de amplificação foram realizados segundo o protocolo publicado pelos autores e, no caso dos locos em que não foi obtido êxito de amplificação, foram testadas diferentes temperaturas de anelamento para os *primers* (50, 54, 56 e 58^{o}C). Aqueles que continuaram sem resposta tiveram modificada sua concentração de reagentes $MgCl_2$ e Taq DNA polimerase.

Foram excluídos por não amplificação os locos BTd-26 e BTb-55 (TSAGKARAKOU et al., 2003) e BEM-39 e BEM-12. Já o loco BEM-14ii (DE BARRO et al., 2003) amplificou uma região fora do tamanho esperado e também foi descartado das análises. Muito embora todos os locos pré-selecionados tenham sido visualizados em gel de agarose 2,4% e alguns em gel de acrilamida corado com nitrato de prata, dois deles (locos BTb-69 e BT83) não apresentaram boa resolução quando analisados no sequenciador, apresentando sinal muito fraco. Mesmo após novas tentativas na mudança de concentração de reagentes e temperatura de anelamento, não foram obtidos bons resultados das amplificações e ambos tiveram que ser descartados das análises de genotipagem e caracterização genética dos indivíduos.

4.3.2 Desenvolvimento de locos SSR

O banco de microssatélites desenvolvido a partir de uma população exclusivamente brasileira do biótipo B de *B. tabaci* é inédito. De um total de 96 clones sequenciados, 27 sequências contendo microssatélites com bom número de nucleotídeos repetidos foram identificadas, das quais 21 puderam ser aproveitadas para desenho dos respectivos *primers*. Desses, oito pares de *primers* foram sintetizados e seus locos caracterizados, sendo três deles incorporados às análises deste estudo.

Portanto, para a genotipagem das populações foram utilizados oito locos microssatélites, sendo cinco publicados e três do banco desenvolvido e ainda não publicado. As respectivas temperaturas de anelamento, número de alelos e amplitude alélica desses locos encontram-se na tabela 2. DE BARRO (2005) utilizou 15 locos microssatélites para caracterizar 775 indivíduos pertencentes a várias populações do Ásia-Pacífico, enquanto TSAGKARAKOU et al. (2007) utilizaram a combinação de seis locos na avaliação de 159 indivíduos distribuídos em seis populações para discriminação dos biótipos Q e B, e no mesmo ano SIMÓN et al. (2007) genotiparam seis populações de 15 indivíduos com cinco locos microssatélites.

4.4 Parâmetros de Diversidade Genética

Em relação à variação genética, observou-se nível considerável de multialelismo. Um total de 47 alelos foi detectado no conjunto dos locos analisados, sendo o número médio de alelos por loco de 5,9, com variação de dois a 13 alelos, resultado também observado por TSAGKARAKOU & RODITAKIS (2003) examinando seis populações de 18 indivíduos cada, com o mesmo marcador molecular. A população SSP apresentou o maior número médio de alelos por loco (4,125), seguida por BMG, SMT, BSP, FSP e RDF, RUS e BBA, esta última com valor de 2,625 (Tabela 3). O loco MB-02 na população BMG foi o que apresentou maior número de alelos (10), e o loco BTb-103 na população RUS e o loco MB-04 na população BBA apresentaram apenas um alelo.

Tabela 3 - Número de indivíduos, número médio de alelos/loco SSR e estimativas de parâmetros genéticos de diversidade (heterozigosidades esperada – H_e e observada – H_o) em oito populações de *Bemisia tabaci*.

População	N	n_A	He	Ho
SSP	20	4,125	0,5335	0,3891
BSP	20	3,750	0,4840	0,3946
BMG	20	4,000	0,5062	0,4359
RUS	20	2,750	0,3786	0,2673
BBA	11	2,625	0,3965	0,3239
FSP	20	3,000	0,3978	0,3747
SMT	15	3,800	0,4243	0,2343
RDF	15	3,000	0,4299	0,339
Média	-	3,380	0,4438	0,3448

N: número de indivíduos amostrados; n_A: número médio de alelos; H_O: heterozigosidade observada; H_E: heterozigozidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg; SSP: soja – Campinas (SP); BSP: batata – Monte Mor (SP); BMG: batata – São Gotardo (MG); RUS: repolho – Immokalee (FL – EUA); BBA: batata – Mucugê (BA); FSP: feijão – Capão Bonito (SP); SMT: soja – Rondonópolis (MT); RDF: repolho – Brasília (DF).

A heterozigosidade média observada teve seu maior valor na população BMG (0,435) e o menor valor para SMT (0,234). Já a heterozigosidade média esperada para SSP foi a mais alta, com 0,5335, e a mais baixa para RUS, com 0,3786. A H_e média ficou acima da H_o para todas as populações, o que evidencia o déficit de heterozigotos para esta espécie, uma vez que em outros trabalhos realizados com o mesmo marcador para *B. tabaci* isso também foi observado. SIMÓN et al.(2007) explicaram a deficiência de heterozigotos encontrada em seu material de estudo pela possível presença de alelos nulos, ou seja, a falta artificial de alelos que pode ocorrer devido a uma amplificação diferencial de um alelo ou ainda o não anelamento do *primer* durante a PCR como resultado de mutações no sítio de anelamento dele (PEMBERTON et al., 1995). DE BARRO (2005) assume que o efeito Wahlund pode ser fonte dessa deficiência, pois, se uma população é de alguma forma subdividida de maneira desigual em relação as frequências alélicas, os acasalamentos ao acaso ocorrerão em uma porção desta população, e dessa forma essa deficiência ficará aparente se estas subpopulações forem coletadas como uma única unidade. Porém, este autor prefere explicar a deficiência através dos aspectos biológicos do inseto, partindo da premissa de que, sendo um colonizador preferencial de plantas de vida curta e que a colonização de certa cultura seja feita primeiramente por poucos genótipos, as chances de

endogamia (acasalamento entre parentes) aumentam, o que pode levar à deficiência de heterozigotos observada.

4.4.1 Equilíbrio de Hardy - Weinberg

Pelo teste exato de Fisher, verificou-se que as populações se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg, para a maioria dos locos estudados (Tabela 4). Analisando os resultados por loco, foi observado que MB-02, BT-4 e BEM-37 desviaram do equilíbrio, apresentando valor de $P<0,05$.

Tabela 4 - Probabilidades do Teste Exato de Fisher para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg obtidas para oito locos SSR em oito populações de *Bemisia tabaci*.

Loco	SSP	BSP	BMG	RUS	BBA	FSP	SMT	RDF
MB-02	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0085	0,0000	0,0000	0,0000
MB-04	1,0000	1,0000	0,0138	0,0229	-	1,0000	-	0,5280
MB-05	1,0000	0,0109	0,9294	0,5853	0,2134	0,0000	1,0000	1,0000
BTb-69	0,0553	0,2849	0,5638	-	1,0000	0,2596	-	-
BTb-103	0,3497	0,1814	1,0000	-	1,0000	0,5484	-	-
BT-4	0,0000	0,0002	0,0000	0,0000	0,0002	0,0000	0,0000	0,0008
BEM-37	0,0022	0,0001	0,0000	0,0000	0,5897	1,0000	-	-
BEM-15	0,3848	0,0855	0,2560	1,0000	1,0000	0,6085	0,5053	1,0000

(-) = Equilíbrio de Hardy-Weinberg não pode ser calculado devido à população apresentar apenas um alelo por loco. SSP: soja – Campinas (SP); BSP: batata – Monte Mor (SP); BMG: batata – São Gotardo (MG); RUS: repolho – Immokalee (FL – EUA); BBA: batata – Mucugê (BA); FSP: feijão – Capão Bonito (SP); SMT: soja – Rondonópolis (MT); RDF: repolho – Brasília (DF).

Para saber se o desvio no equilíbrio para estes locos era decorrente de uma deficiência de heterozigotos, foi realizado o "teste U". A hipótese nula considerada foi a mesma do teste anterior, portanto $P<0,05$ significa deficiência de heterozigotos (Tabela 5).

Tabela 5 - Teste "U" realizado para verificar desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg por deficiência de heterozigotos para todos os locos em todas as populações de *Bemisia tabaci*.

Loco	MB-02	MB-04	MB-05	BTb-69	BTb-103	BT-4	BEM-37	BEM-15
	0,0000	**1,0000**	**1,0000**	**0,0853**	**0,2682**	**0,0000**	**0,0000**	**0,9124**

O "teste U" confirmou o desvio devido ao déficit de heterozigotos nos três locos em questão e reforçou que todos os outros locos avaliados se encontram dentro dos padrões de equilíbrio. Essa deficiência de heterozigotos pode ser explicada pelo grande número de alelos que estes locos apresentaram, sendo que provavelmente o tamanho amostral (N) das populações não foi suficiente para satisfazer todas (ou pelo menos a maior parte) das possíveis combinações de genótipos esperadas para o loco. Segundo WEIR (1996), a ausência do equilíbrio pode ser explicada por cruzamentos não aleatórios ou ainda efeitos de seleção e ou migração além do pequeno tamanho amostral, que parece ser o caso deste estudo.

4.5 Estrutura Genética das Populações

As estatísticas F de Wright possibilitam a caracterização da distribuição da variabilidade genética entre as populações (F_{ST}), bem como dos níveis médios de endogamia no nível populacional (F_{IS}) e total (F_{IT}) (WRIGHT, 1965). O cálculo das Estatísticas F foi realizado pela metodologia de WEIR & COCKERHAM (1984), e a tabela 6 apresenta os valores obtidos com seus respectivos intervalos de confiança.

Tabela 6 - Estimativas das estatísticas F de Wright, em oito populações de *Bemisia tabaci* a partir de oito locos microssatélites. Intervalo de confiança (IC) de 95% de probabilidade.

	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
Estimativa	**0,2383**	**0,33899**	**0,13219**
Limite Superior (IC 95%)	0,55007	0,62985	0,19915
Limite Inferior (IC 95%)	-0,09082	0,00687	0,07363

O F_{IT}, calculado entre todas as populações e locos, apresentou valor de 0,34 (Tabela 6), sendo significativo. Esse resultado revela que há algum fator atuando nas populações de forma a estruturá-las, que pode ser relativo à endogamia pela subdivisão ou pelo sistema reprodutivo do inseto.

A estimativa de F_{IS} para todas as populações e locos não diferiu significativamente de zero, portanto não apresenta grande influência sobre a distribuição da variabilidade nas populações do estudo. Porém, os dados de F_{IS} para cada população (Tabela 7) revelaram que apenas FSP e RDF não apresentaram valores significativos, sendo que a população SMT obteve o maior valor (0,47), enquanto BMG obteve o menor valor (0,16).

Tabela 7 - Valores de F_{IS} e seus respectivos intervalos de confiança calculados para diferentes populações de *Bemisia tabaci* a partir de oito locos microssatélites (SSR).

Populações	SSP	BSP	BMG	RUS	BBA	FSP	SMT	RDF
Estimativa	**0,29639**	**0,2113**	**0,16516**	**0,31954**	**0,23257**	**0,08458**	**0,47514**	**0,2524**
Limite superior (IC 95%)	0,38094	0,30328	0,25999	0,45474	0,2844	0,18501	0,64103	0,48002
Limite inferior (IC 95%)	0,15502	0,04942	0,01169	0,11171	0,03032	-0,08448	0,28538	-0,04591

SSP: soja – Campinas (SP); BSP: batata – Monte Mor (SP); BMG: batata – São Gotardo (MG); RUS: repolho – Immokalee (FL – EUA); BBA: batata – Mucugê (BA); FSP: feijão – Capão Bonito (SP); SMT: soja – Rondonópolis (MT); RDF: repolho – Brasília (DF).

Em relação à estruturação das populações, o F_{ST} obteve valor de 0,13 e significativo, classificado como moderado, ou seja, essas populações estão começando a se diferenciar em consequência da diminuição do fluxo de genes entre elas.

Os valores obtidos de F_{ST} por pares de populações encontram-se resumidos na tabela 8. Foi observado que a população mais estruturada parece ser a RDF, com valores de 0,05 em relação a SMT até 0,28 em relação a FSP, o que indica que essas duas populações estão isoladas uma da outra, sem aparente fluxo gênico. A população SMT também se mostrou diferenciada em relação às outras, com a exceção de RDF.

Tabela 8 - Valores de F_{ST} calculados entre as populações de *Bemisia tabaci* a partir de oito locos microssatélites (SSR).

	BSP	BMG	RUS	BBA	FSP	SMT	RDF
SSP	**0,04627**	**0,0686**	**0,09612**	**0,07666**	**0,12127**	**0,15178**	**0,21862**
BSP		**0,0662**	**0,08123**	**0,07076**	**0,13188**	**0,20808**	**0,25185**
BMG			**0,09405**	**0,16554**	**0,10874**	**0,17563**	**0,20954**
RUS				**0,11328**	**0,12182**	**0,17742**	**0,20338**
BBA					**0,21002**	**0,11553**	**0,17588**
FSP						**0,25307**	**0,28684**
SMT							**0,05535**

SSP: soja – Campinas (SP); BSP: batata – Monte Mor (SP); BMG: batata – São Gotardo (MG); RUS: repolho – Immokalee (FL – EUA); BBA: batata – Mucugê (BA); FSP: feijão – Capão Bonito (SP); SMT: soja – Rondonópolis (MT); RDF: repolho – Brasília (DF).

Um caso relevante pode ser notado na população coletada em feijoeiro da localidade de Capão Bonito (FSP). Essa população apresenta-se diferenciada das duas outras localizadas no mesmo Estado (SP), que são a de batata, Monte Mor [BSP (0,13)], e a de soja, Campinas [SSP (0,12)], as quais apresentam valor de F_{ST} de apenas 0,04 entre si, ou seja, há alta troca de alelos entre elas. O estreitamento entre essas duas populações é facilitado pela localização geográfica, haja vista que BSP e SSP são bem próximas (30 km), enquanto que FSP encontra-se a aproximadamente 200 km de distância de ambas. Porém, quando se coloca a distância geográfica como um fator de divisão de populações, ela nem sempre explica a estrutura apresentada, sendo que SSP e BMG, por exemplo, têm F_{ST} de 0,06 e são distantes 600 km uma da outra. A população de Mucugê, na Bahia (BBA), e as de Campinas (SSP) e Monte Mor (BSP) também possuem baixo índice de F_{ST}; apenas 0,07 entre elas. Outra explicação plausível é referente ao uso elevado de inseticidas em larga escala nessa região e, em especial, na cultura do feijão em Capão Bonito (Alisson F. Chiorato, comunicação pessoal), sendo que esse fator pode alterar a frequência alélica das populações (DE BARRO, 2005). Também se pode levar em conta o fator hospedeiro, o qual pode exercer uma pressão de seleção sobre a população que o coloniza, fazendo com que as frequências alélicas se modifiquem de acordo com a necessidade de adaptação para a cultura. Porém, para confirmar a influência do hospedeiro sobre a praga seria necessário um estudo com uma população de *B. tabaci* de outra cultura próxima ao feijão nessa

localidade e uma população ocorrendo em feijão de uma localidade mais distante, para que todos os outros fatores fossem excluídos.

As populações de mosca-branca ocorrendo em lavouras de batata, que despertaram o interesse deste estudo, apresentaram valores de F_{ST} (por pares) mais baixos do que nas demais culturas. Avaliando os dados de F_{ST} entre essas três localidades (BMG, BSP e BBA), o maior valor encontrado foi entre BBA e BMG (0,16) e o menor entre BSP e BMG (0,06). Adicionalmente, os valores de F_{IS} foram relativamente baixos para este índice (0,1651; 0,2113 e 0,08458, respectivamente), indicando que estas populações não apresentam elevada taxa de endogamia. No geral, as populações procedentes da cultura da batata revelaram baixa estruturação genética e alta diversidade.

A população de moscas brancas coletadas na cultura do repolho nos EUA (RUS), que teoricamente deveria apresentar-se mais diferenciada em relação às populações brasileiras em função da distância geográfica, apresentou valores de F_{ST} em sua maioria intermediários. A não diferenciação de RUS pelo F_{ST} em relação às demais populações brasileiras corrobora a ideia de que o biótipo B da mosca branca foi introduzido dos EUA na região de Campinas, de onde teria se espalhado para outras regiões brasileiras (LOURENÇÃO & NAGAI, 1994). Como a introdução do biótipo B é relativamente recente no país, tendo sido constatados os primeiros surtos somente a partir dos anos 90, provavelmente a diferenciação genética das populações no país ainda seja pequena.

4.5.1 Estruturação a partir de distâncias genéticas e do modelo UPGMA

As distâncias genéticas de NEI (1978) calculadas entre as populações de mosca branca variaram de 0,062 a 0,433 (Tabela 10). A partir desses resultados foi obtida a classificação hierárquica das populações por meio do modelo UPGMA, cujo dendrograma está apresentado na figura 13. Esta análise revela que a menor distância encontrada foi entre SMT e RDF, e entre essas populações e as demais foi verificada a maior distância, de 0,88.

Foram formados dois grupos maiores, separando as populações do Centro-oeste do país (G2) das populações das demais regiões. Dentro do grupo 1 (G1), foram agrupadas aproximadamente em 0,94 duas das populações de São Paulo: SSP e BSP. Com 0,92, a população BBA se agrupou a essas duas, seguida pela RUS e, com valor de distância genética superior, uniram-se a BMG e FSP em 0,9, mostrando-se as mais divergentes do G1 (Figura 13).

O dendrograma revelou uma relação entre a distância genética e geográfica (observada para as populações BSP/SSP e SMT/RDF), muito embora o coeficiente de correlação obtido pelo teste de Mantel não tenha sido significativo (r= 0,36 sendo p= 0,134).

Tabela 9 - Distâncias genéticas de NEI (1978), calculadas entre oito populações de *Bemisia tabaci*.

	SSP	BSP	BMG	RUS	BBA	FSP	SMT
BSP	0,06						
BMG	0,10	0,08					
RUS	0,10	0,08	0,09				
BBA	0,09	0,08	0,21	0,10			
FSP	0,13	0,14	0,11	0,10	0,21		
SMT	0,19	0,30	0,26	0,24	0,14	0,35	
RDF	0,32	0,40	0,34	0,29	0,22	0,43	0,06

SSP: soja – Campinas (SP); BSP: batata – Monte Mor (SP); BMG: batata – São Gotardo (MG); RUS: repolho – Immokalee (FL – EUA); BBA: batata – Mucugê (BA); FSP: feijão – Capão Bonito (SP); SMT: soja – Rondonópolis (MT); RDF: repolho – Brasília (DF).

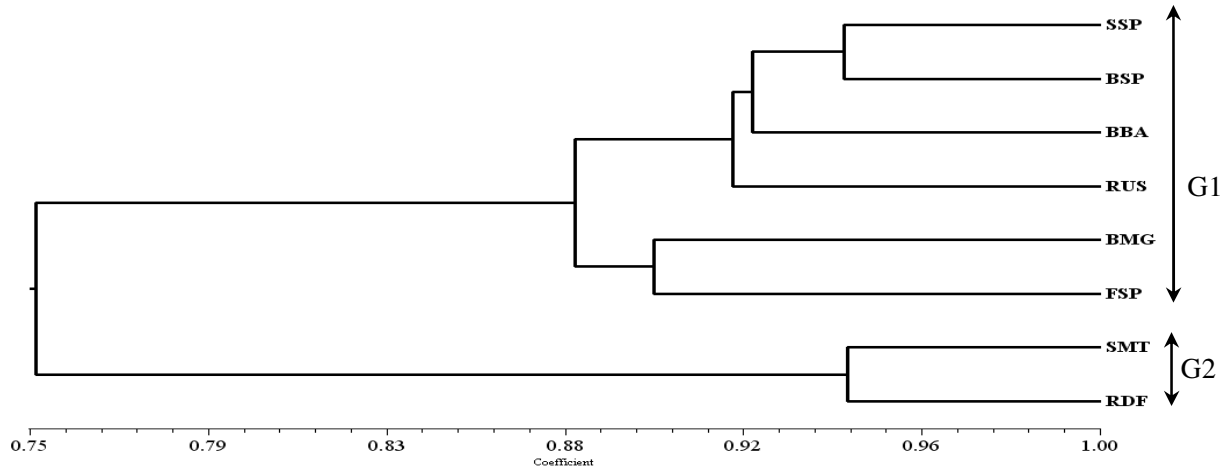

Figura 13 - Estruturação da divergência genética entre oito populações de *Bemisia tabaci*, definida pelo método UPGMA de agrupamento, a partir nas das distâncias genéticas de Nei (1978). SSP: soja – Campinas (SP); BSP: batata – Monte Mor (SP); BMG: batata – São Gotardo (MG); RUS: repolho – Immokalee (FL – EUA); BBA: batata – Mucugê (BA); FSP: feijão – Capão Bonito (SP); SMT: soja – Rondonópolis (MT); RDF: repolho – Brasília (DF).

4.5.2 Estruturação a partir do programa Structure

Para análise da estruturação da diversidade sem hierarquização *a priori*, foi empregada a abordagem bayesiana realizada pelo programa STRUCTURE. Foram testados os valores de K variando de 2 a 10, sendo o número real escolhido a partir desses valores (EVANNO et al., 2005). Por essa metodologia, verificou-se o valor ótimo de K=2 e a quase totalidade dos indivíduos apresentou Q>0,8 (Figura 14).

A estrutura genética revelada pelo programa Structure é relacionada ao resultado obtido com a distância de NEI (1978), que revelou duas principais populações geneticamente distintas. A primeira, representada pela cor verde, compreendendo indivíduos das populações FSP, BMG e RUS. A segunda população, representada pela cor vermelha, reuniu indivíduos do Distrito Federal (RDF), Mato Grosso (SMT) e São Paulo (SSP). Os indivíduos das populações de batata da Bahia (BBA) e de São Paulo (BSP) foram separados nos dois grupos. O Structure manteve as duas populações do Centro-oeste agrupadas, separando-as de FSP, BMG e RUS. As populações BSP e BBA compartilham indivíduos nos dois grupos, o que evidencia a diversidade encontrada nos insetos colonizando lavouras de batata. O consenso de dois grupos separando as populações de estudo, observado tanto no Structure quanto no dendrograma, pode indicar, como já discutido, a hipótese de mais de uma população fundadora e, para os dados deste estudo, mais precisamente duas. Deve ser ressaltado que estes grupos compartilham alelos entre si, não sendo possível desvincular uma população ou grupo do outro por completo.

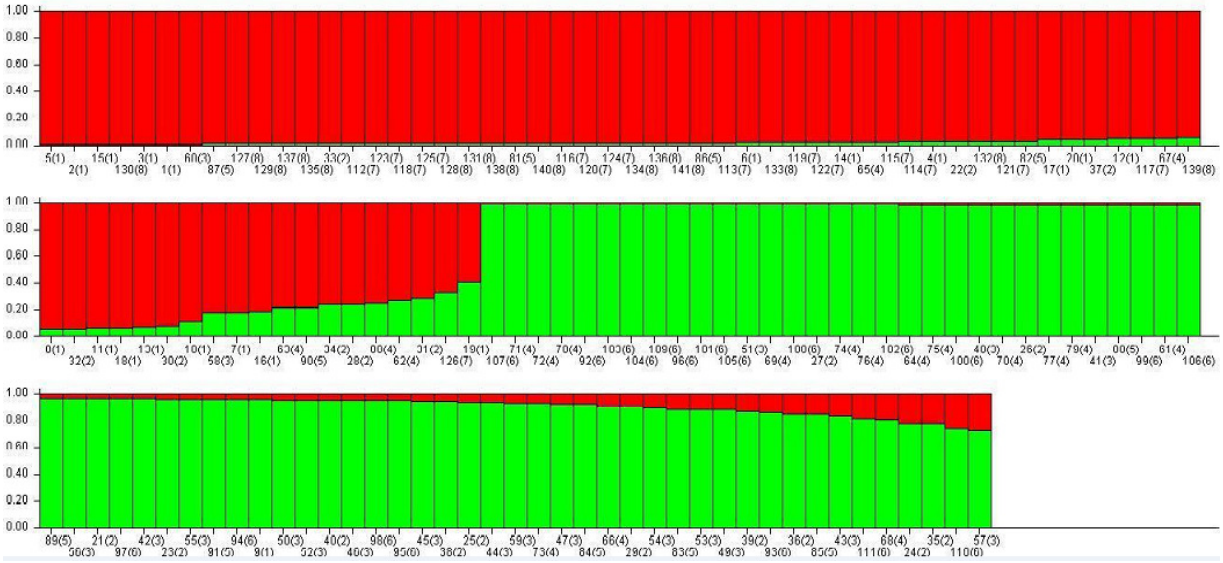

Figura 14 - Teste de atribuição dos indivíduos de *Bemisia tabaci* (K=2). Barras verticais representam indivíduos. A mesma cor em indivíduos diferentes indica que eles pertencem ao mesmo grupo. Cores diferentes no mesmo indivíduo indicam a porcentagem do genoma compartilhado com cada grupo. Os números em cada barra vertical indicam o número do indivíduo e a respectiva população a qual pertence (entre parênteses).

4.5.3 Estruturação a partir do método de componentes principais

Também foram adotadas análises de componentes principais para visualização da estruturação genética de todas as populações analisadas em função das culturas hospedeiras e localidades de coleta dos insetos. Os planos representados pelas principais coordenadas principais foram obtidos a partir da distância de NEI (1978). A figura 15 resume a estrutura genética obtida nos indivíduos de todas as populações estudadas em função das componentes principais 1 e 2, cuja variância acumulada foi de 28,5 e 25,3%, respectivamente, totalizando 53,8% da variação total.

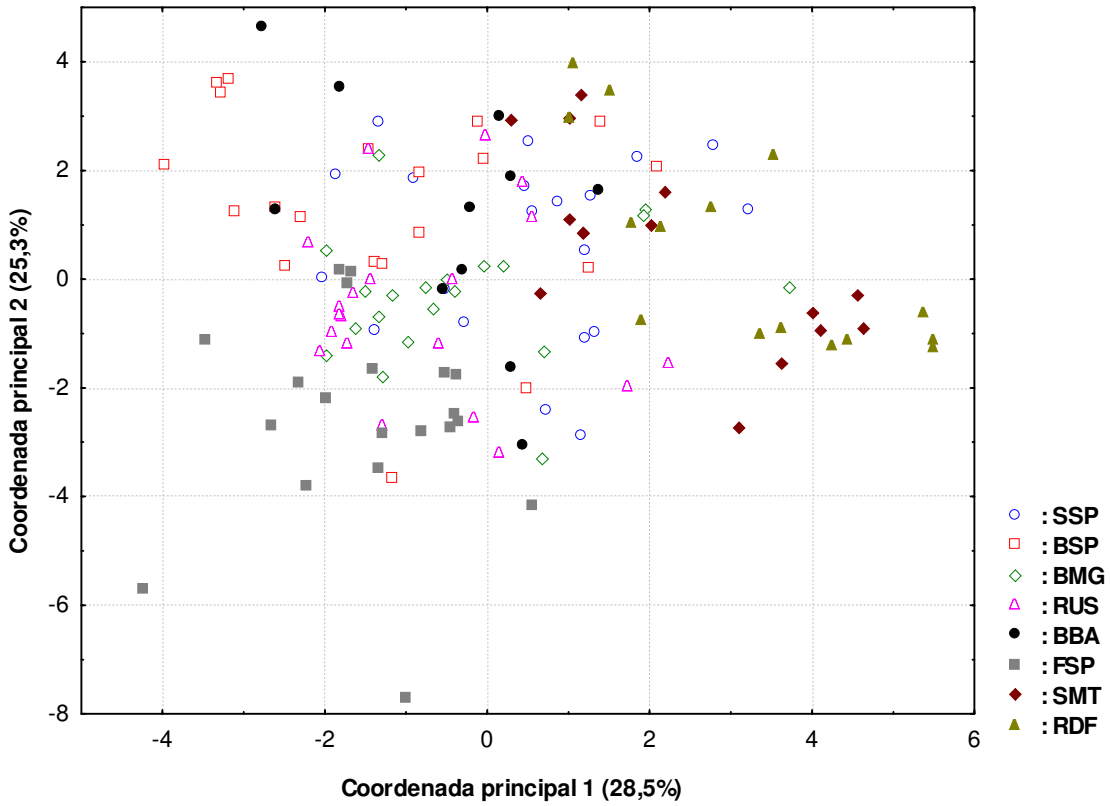

Figura 15 - Plano representado pelas coordenadas 1 e 2 da análise de componentes principais a partir de distâncias genéticas (NEI, 1978) obtidas do marcador molecular SSR entre as populações de *Bemisia tabaci* analisadas neste estudo. SSP: soja – Campinas (SP); BSP: batata – Monte Mor (SP); BMG: batata – São Gotardo (MG); RUS: repolho – Immokalee (FL – EUA); BBA: batata – Mucugê (BA); FSP: feijão – Capão Bonito (SP); SMT: soja – Rondonópolis (MT); RDF: repolho – Brasília (DF).

A figura 15 revela grande divergência genética entre os indivíduos de mosca branca analisados, que pode ser verificada pela dispersão deles no plano da figura, com especial destaque para os insetos das populações de São Paulo, das três culturas hospedeiras (SSP, BSP e FSP), provavelmente por ter sido o Estado onde o biótipo B foi primeiramente encontrado. Também, que a estrutura genética das populações amostradas é relativamente fraca, conforme se verifica pela sobreposição de indivíduos das populações do estudo, com exceção dos indivíduos das populações de mosca branca do Distrito Federal ocorrendo em repolho (RDF) e no Mato

Grosso, em soja (SMT), que se posicionaram com reduzida sobreposição em relação aos indivíduos das demais populações.

A distribuição da diversidade genética dessas populações pode ser interpretada com base na introdução do inseto no país. O primeiro relato de *B. tabaci* foi em 1923 (BONDAR, 1928), no Estado da Bahia, sendo essa população referente ao biótipo nativo, o A, sendo que apenas no final da década de 60 ocorreram surtos populacionais no Paraná e na região sul de São Paulo (COSTA et al., 1973). A introdução do biótipo B no país foi registrada por aumentos consideráveis nas populações no início dos anos 90, relatadas no Estado de São Paulo (LOURENÇÃO & NAGAI, 1994). A região Nordeste do país também apresenta infestação das culturas por este inseto, sendo reportados surtos no ano 2000 no Maranhão, por LOURENÇÃO et al. (2001), e na Bahia, onde verificou-se a ocorrência de altas populações de mosca-branca colonizando o maracujazeiro e outras plantas daninhas (YUKI et al., 2002).

É provável que a introdução de material vegetal infestado pelo biótipo B tenha sido feita no Brasil pela região Sudeste, onde foram registrados os primeiros surtos populacionais, como descrito por LOURENÇÃO & NAGAI (1994), como também pode ser evidenciada pela elevada diversidade genética encontrada nos indivíduos dessa região do país. As populações antes existentes foram submetidas à pressão de seleção provocada pelo novo biótipo que, com taxa de natalidade maior que o biótipo existente, acabou ocupando os espaços antes habitados pelo primeiro. Atualmente, o biótipo A não é mais encontrado nas áreas de agricultura intensiva do país. Porém, é possível que em alguns locais, como as regiões Nordeste e Centro-oeste, a chegada deste biótipo tenha ocorrido de maneira mais lenta, talvez em populações menores que, uma vez em simpatria, possibilitaram a ocorrência de introgressão entre os biótipos A e B, o que explicaria a maior similaridade genética encontrada entre RDF e SMT e a distinção dessas duas populações em relação às demais, por apresentarem frequências alélicas mais semelhantes ou maior número de alelos em comum.

LIMA et al. (2000), por meio de análises moleculares com o marcador RAPD, encontraram os biótipos A (o nativo BR) e B ocorrendo na mesma região nos Estados do Mato Grosso, Goiás e Rio de Janeiro. LIMA et al (2002) relacionaram a diferenciação das populações de seu estudo, revelada pelas distâncias genéticas e pela AMOVA, tanto à introdução do biótipo B de forma dispersa quanto pela aplicação excessiva de inseticidas ou até pelo cruzamento do biótipo nativo com o introduzido, B.

Em estudo realizado por OLIVEIRA et al. (1999), utilizando o marcador molecular RAPD, foi encontrado um padrão similar de bandas de uma população coletada em Goiânia (GO) com amostras de *B. tabaci* dos EUA (biótipo A). No presente estudo, realizado com RAPD (FONTES et al, 2010) com as populações do Distrito Federal (RDF) e Mato Grosso (SMT e AMT), também foi possível notar uma proximidade entre elas e sua consequente separação do resto das populações analisadas, sendo que com o marcador utilizado foi possível apenas inferir sobre uma estruturação relacionada à região geográfica na qual elas se encontram. Essas observações reforçam a existência de uma provável relação inicial entre o biótipo nativo e o B na região Centro-oeste, que pode ter acarretado em fluxo gênico entre eles, formando populações que apresentam um genoma compartilhado, pois os resultados obtidos não são consistentes para separar os indivíduos de SMT e RDF num biótipo diferente do B.

BEDFORD et al. (1994) obtiveram sucesso no cruzamento entre diferentes populações do biótipo B coletadas de várias regiões geográficas diferentes. Porém, não foram observados cruzamentos entre indivíduos "não B" com B. PERRING et al (1993) acusaram a incompatibilidade sexual entre os dois biótipos em experimento em laboratório, no qual não foi observada descendência para cruzamentos entre fêmeas e machos de A e B. Os autores sugeriram que se trata de espécies diferentes, sendo o biótipo B descrito como *Bemisia argentifolii* (BELLOWS & PERRING). Porém, essa nova classificação não foi aceita pela comunidade científica e estudos de relação de parentesco entre biótipos de *B. tabaci* continuam sendo executados no mundo todo. Mais recentemente, BROWN et al (2001) reportaram terem conseguido cruzamentos entre esses dois biótipos e outros trabalhos também revelaram êxito no cruzamento entre o B e biótipos nativos do Sudão (BYRNE et al., 1995), da Austrália (DE BARRO & HART, 2000; GUNNING et al., 1997) e com o biótipo Q na Espanha (RONDA et al., 1999).

Contudo, se ainda assim adotarmos a hipótese de não ocorrência de cruzamentos entre biótipos diferentes, como apresentado por alguns autores, poderíamos supor que a diferenciação genética encontrada entre as populações da região CO e as demais seja resultado da introdução do biótipo B nessa região de forma independente ou como resultado de efeito *bottleneck*, provocado pela dispersão antrópica do inseto do seu centro original de introdução no Brasil para a região CO, como já discutido anteriormente no capítulo RAPD do presente estudo (FONTES et al. 2010).

4.5.3 Estruturação genética comparando o programa Structure e o método de componentes principais

A figura 16 apresenta o resultado da análise de componentes principais realizada com os mesmos dados de marcadores moleculares e as mesmas populações de estudo utilizadas para obtenção dos grupamentos obtidos pelo Structure, representados pelas barras vermelhas e verdes. Nessa figura foram identificados os dois principais grupos evidenciados pelo programa acima citado (Pop 1 e Pop 2). A divisão dos dois grupos formados segundo a abordagem bayesiana com os indivíduos dispersos de acordo com a distância genética adotada, revelou grande semelhança entre ambos os procedimentos de análise de estruturação da diversidade genética.

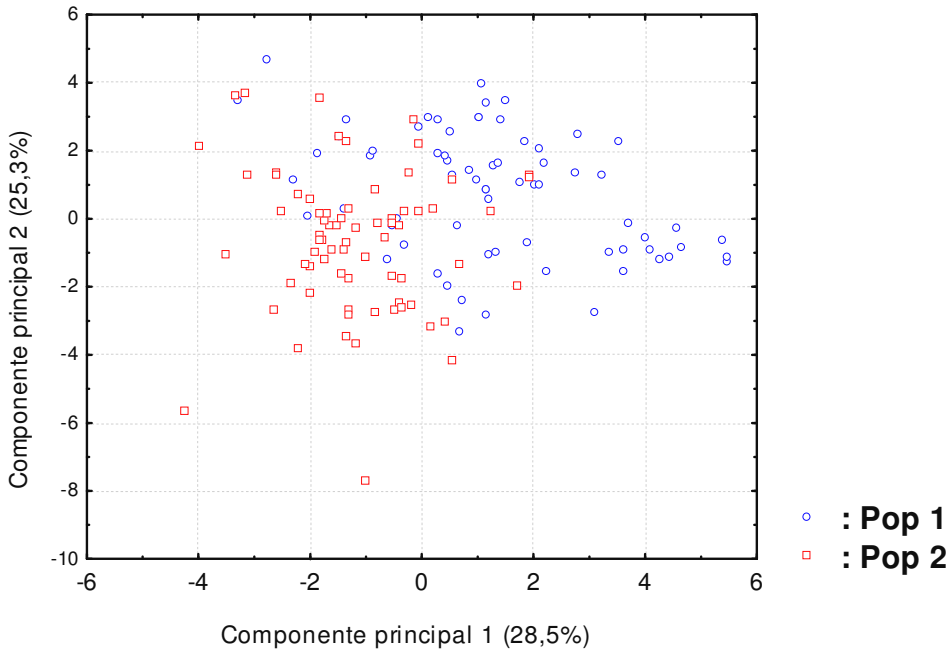

Figura 16 - Plano representado pelas coordenadas 1 e 2 da análise de componentes principais a partir de distâncias genéticas (NEI, 1978) obtidas do marcador molecular SSR entre indivíduos de diferentes populações de *Bemisia tabaci*. A diferenciação entre as duas populações (Pop 1 e Pop 2) são relativas ao agrupamento observado em análise realizada no programa Structure.

4.5.3 Estruturação por planta hospedeira e por localização geográfica

Para elucidar um pouco mais o tipo de estruturação ocorrendo nas populações estudadas, foram feitos gráficos de ACP em agrupamentos por plantas hospedeiras em geral, por cultura em virtude da localização (as que apresentaram culturas de duas localidades ou mais) e por região geográfica.

O gráfico de dispersão por planta hospedeira (Figura 17) revelou que aparentemente não há estruturação devido a esse fator, uma vez que houve grande interação entre todos os tipos de culturas onde foram coletadas as populações, não sendo possível desvincular uma da outra.

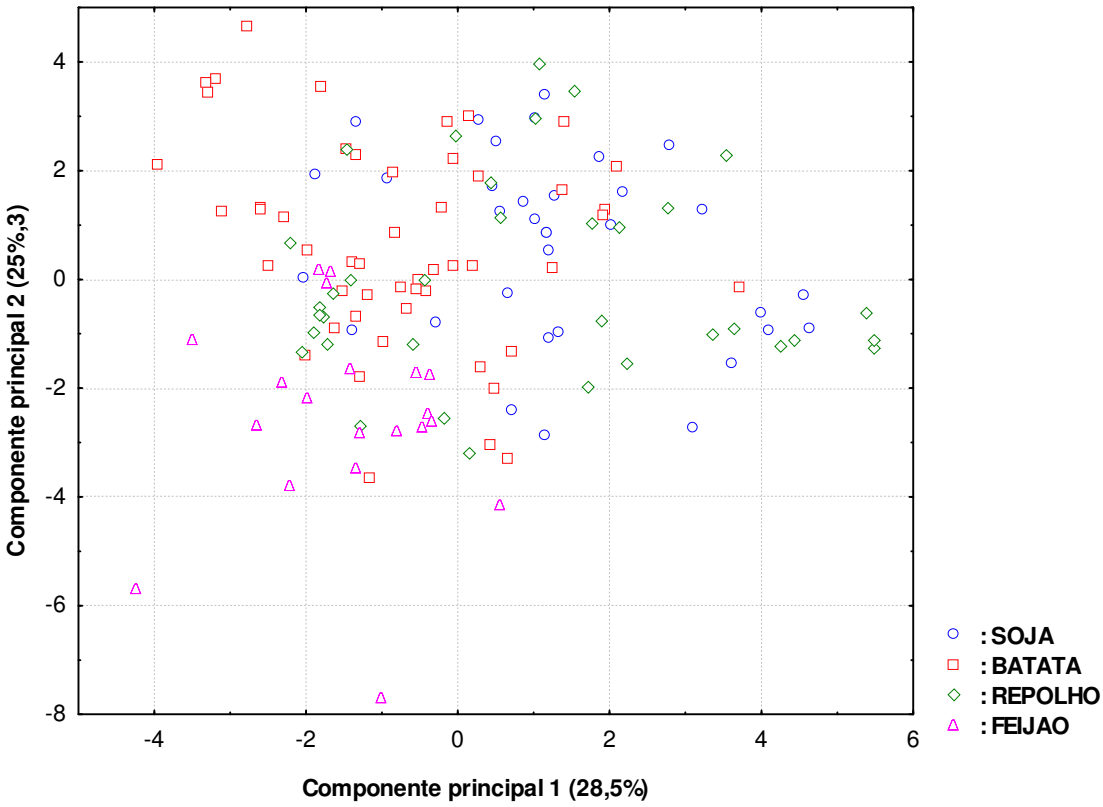

Figura 17 - Plano representado pelas coordenadas 1 e 2 da análise de componentes principais a partir de distâncias genéticas (NEI, 1978) obtidas do marcador molecular SSR entre indivíduos de *Bemisia tabaci* ocorrendo em diferentes plantas hospedeiras.

A cultura da soja, que serviu de hospedeira para populações tanto de São Paulo quanto do Mato Grosso, foi ilustrada no gráfico de dispersão da figura 18. Nesse caso, o eixo *x* dividiu essas populações entre si, porém com um significativo número de indivíduos apresentando alelos em comum. Essa subdivisão dentro de indivíduos que colonizam a mesma cultura pode ser em virtude dos diferentes tipos de manejo aplicado para cada região, além de fatores como o clima, predadores naturais, fatores nutricionais, além da observação de uma alta taxa de endogamia para SMT (a maior dentre todas), que pode afetar a frequência alélica nessas populações e levar a uma diminuição da variabilidade genética, gerando indivíduos geneticamente mais parecidos (DE BARRO, 2005).

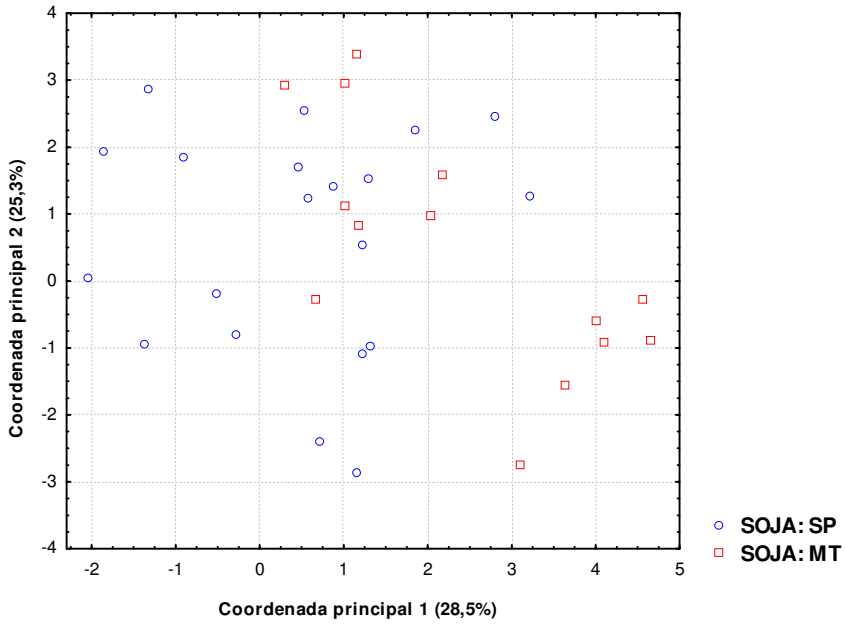

Figura 18 - Plano representado pelas coordenadas 1 e 2 da análise de componentes principais a partir de distâncias genéticas (NEI, 1978) obtidas do marcador molecular SSR entre indivíduos de *Bemisia tabaci* ocorrendo em lavouras de soja no Mato Grosso e em São Paulo.

No caso da visualização da estrutura genética em função apenas da cultura da batata como hospedeira, em que foram coletados insetos de três locais distintos (SP, MG e BA), o resultado

obtido não apresentou a mesma característica da soja, ou seja, não foi possível verificar uma subestruturação capaz de separá-las. Foi observado apenas um grupo relativamente homogêneo, com um sutil agrupamento dos indivíduos pertencentes a BMG, conforme se verifica na figura 19. Esse resultado é corroborado pelos valores de baixa magnitude de F_{ST} encontrados entre essas populações. Porém, o grau de diversidade genética encontrado na cultura da batata foi relativamente elevado, assim como no caso do marcador RAPD. Uma das hipóteses comentadas anteriormente seria em função da fraca estrutura genética observada em *B. tabaci* da região Sudeste, onde os indivíduos que teriam migrado para cultura da batata mais recentemente teriam boa representatividade alélica das populações de origem. Além disso, esse recente hospedeiro não deve ter oferecido resistência à infestação pelo inseto, ou seja, não deve ter ocorrido pressão de seleção à adaptação do inseto nessa cultura.

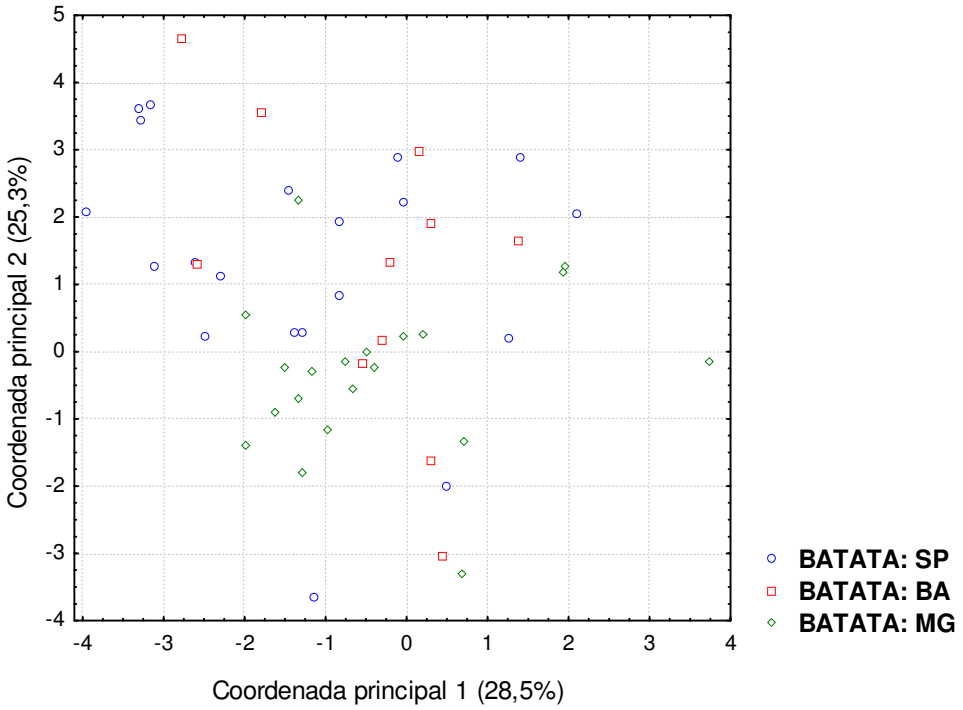

Figura 19 - Plano representado pelas coordenadas 1 e 2 da análise de componentes principais a partir de distâncias genéticas (NEI, 1978) obtidas do marcador molecular SSR entre indivíduos de *Bemisia tabaci* ocorrendo em lavouras de batata em São Paulo, Minas Gerais e Bahia.

A comparação entre as populações na cultura do repolho, que englobam RDF e RUS, foi a que possibilitou observar a maior divergência genética ocorrendo dentro de uma mesma cultura em localidades diferentes (Figura 20). Não se pode descartar o fato de que RUS é uma população de outro país, o que amplia as chances de diferenciação genética entre as duas. Porém, como já foi visto, RUS parece englobar quase toda a diversidade das populações aqui encontradas. No entanto, RDF apresentou-se a mais divergente entre todas as populações do estudo, e o mais provável seria a estruturação observada.

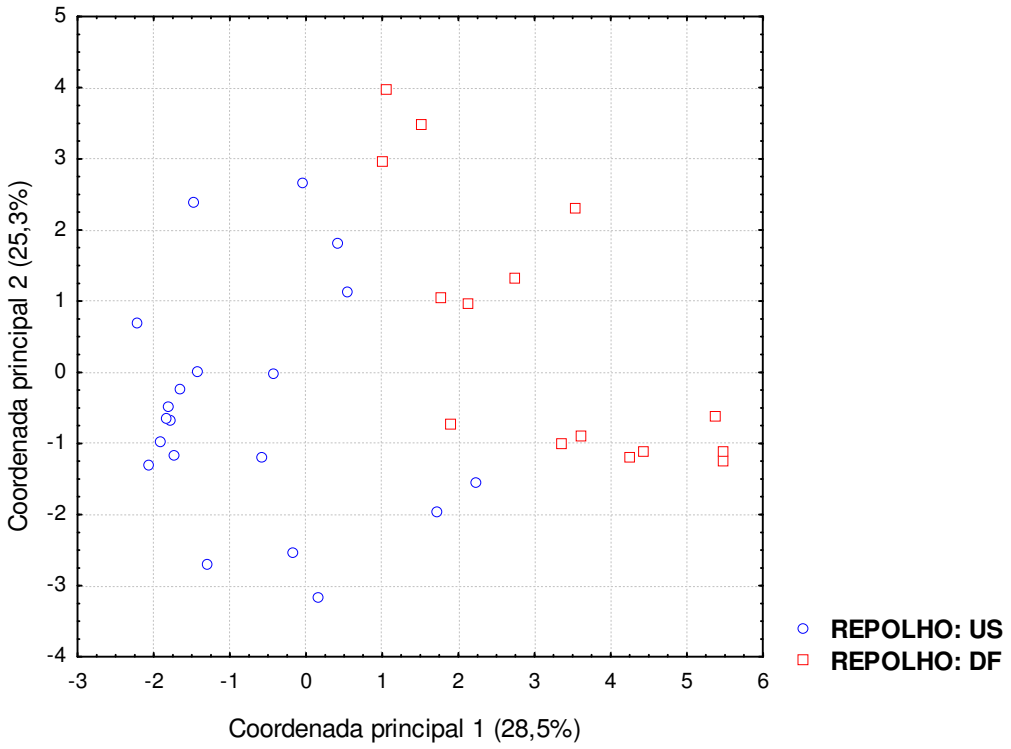

Figura 20 - Plano representado pelas coordenadas 1 e 2 da análise de componentes principais a partir de distâncias genéticas (NEI, 1978) obtidas do marcador molecular SSR entre indivíduos de *Bemisia tabaci* ocorrendo em plantações de repolho no Distrito Federal e na Flórida (EUA).

A figura 21 revela a distribuição dos indivíduos em função da região geográfica na qual eles se inserem. Nota-se visível estruturação dividindo a região Centro-oeste (que engloba SMT e

RDF) da Sudeste (que engloba SSP, BSP, FSP e BMG), o que apenas reforça a diferenciação observada para o primeiro grupo. Indivíduos RUS agruparam-se às populações do Sudeste, como já observado no dendrograma. BBA é a única população que representa o Nordeste e apresenta-se bem inserida entre a região Centro-oeste e Sudeste, compartilhando alelos dos dois grupos, com maior tendência ao da região Sudeste. Outra importante observação é referente à magnitude da diversidade genética observada entre os indivíduos da região Sudeste, superior à encontrada nas demais regiões. Muito embora a região SE esteja representada por maior número de populações que as demais, esse dado corrobora a ideia apresentada por LOURENÇÃO & NAGAI (1994) de que o SE foi o centro de surgimento do biótipo B no Brasil e, provavelmente, continua sendo o maior centro de diversidade genética dessa praga no país.

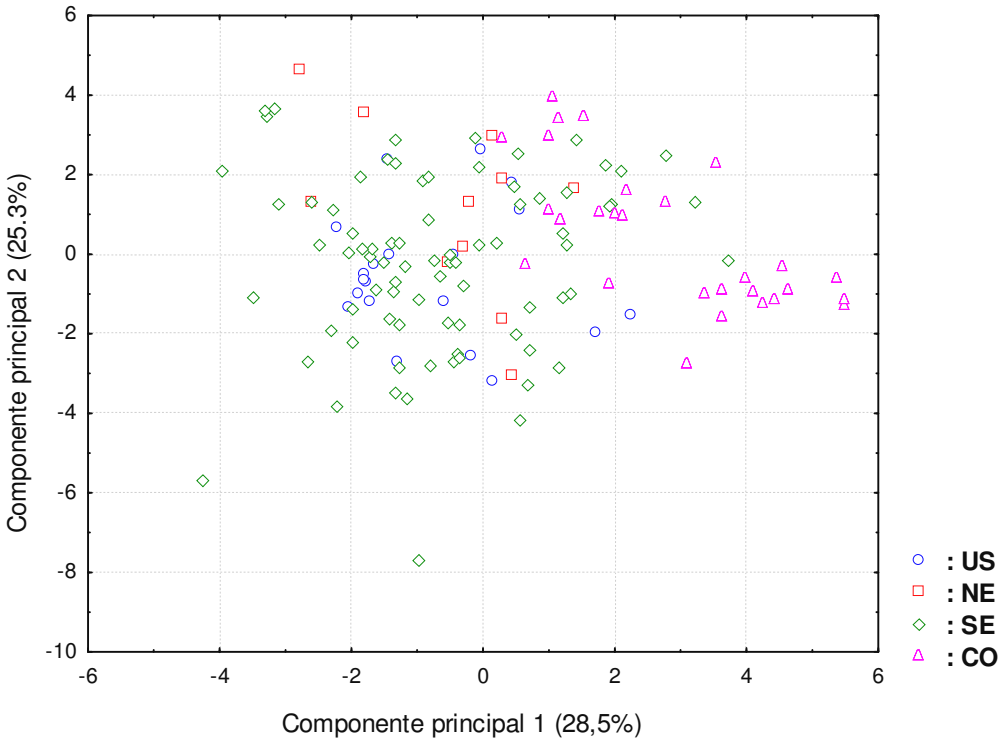

Figura 21 - Plano representado pelas coordenadas 1 e 2 da análise de componentes principais a partir de distâncias genéticas (NEI, 1978) obtidas do marcador molecular SSR entre indivíduos de *Bemisia tabaci* ocorrendo em plantações de diferentes regiões do Brasil [Nordeste (NE), Sudeste (SE)e Centro-oeste (CO)] e nos EUA (US).

4.6 Perspectivas

Desde que se tornou uma praga na agricultura, a mosca branca foi protagonista de vários estudos genéticos, morfológicos e comportamentais, tanto no Brasil quanto no exterior, também motivados pela dificuldade de separação dos seus diversos biótipos pela taxonomia convencional. Assim, os marcadores moleculares ocupam importante destaque pela sua capacidade de quantificar e diferenciar grupos de insetos aparentemente idênticos.

Nesse contexto, os resultados do presente estudo permitiram identificar dois grupos principais geneticamente distintos, representados pelas populações da região Centro-oeste, em oposição às demais. Esse resultado nos leva a pensar que outras diferenças podem estar associadas a essa estrutura genética, tais como diferenças ligadas ao hospedeiro preferencial, grau de dispersão, prolificidade, resistência ou tolerância a certos grupos de inseticidas e a capacidade de transmissão de vírus. Essas diferenças podem ser mais bem exploradas em favor do aumento da eficiência do controle químico ou biológico desse inseto praga e transmissor de viroses.

A suposição de surgimento de novo biótipo na cultura da batata não pôde ser geneticamente comprovada por meio dos marcadores empregados. Apesar de não se poder afirmar, do ponto de vista genético, que houve uma especialização da mosca-branca para adaptação a esse hospedeiro, essa informação não exclui a possibilidade de que algum outro tipo de especialização tenha ocorrido. Portanto, estudos mais adequados, envolvendo aspectos biológicos do inseto em relação à batata, por exemplo, podem ser desenvolvidos para elucidar essa questão.

Foi constatado que os insetos procedentes da cultura do feijoeiro da localidade de Capão Bonito apresentaram-se geneticamente diferenciados dos demais, inclusive do mesmo Estado. Considerando que o plantio de feijão nessa localidade é baseado no uso excessivo de inseticidas, que pode proporcionar o desenvolvimento de indivíduos cada vez mais resistentes, o que é uma característica do biótipo B, esses resultados podem servir de alerta para a adoção de práticas alternativas ao controle do inseto.

5 CONCLUSÕES

a) Tanto os marcadores RAPD quanto os locos microssatélites foram utilizados com sucesso para a análise genética de *B. tabaci*;

b) Houve estruturação genética das populações do inseto devido à localização geográfica. Foram observados dois grupos, um contendo as populações do Centro-oeste (repolho, DF; soja, MT) e outro abrangendo todas as outras populações (repolho, EUA; soja, batata e feijão, SP; batata, MG e BA);

c) A população FSP (feijoeiro, SP) é geneticamente diferenciada das outras localizadas no mesmo Estado (batata e soja);

d) Os indivíduos RUS (repolho, EUA) e BSP, BMG e BBA (batata; SP, MG e BA) apresentaram grande diversidade e pouca diferenciação genética em relação às outras populações.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALJANABI, S.M.; LOIÁCONO, M.S.; LOURENÇO, R.T.; BORGES, M.; TIGANO, M.S. RAPD analisys revealing polymorphism in egg parasitoids of soybean stink bugs (Hemíptera: Pentatomidae). **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, v.27, p.345-352, 1998.

AZEVEDO, F.R.; BLEICHER, E. Distribuição vertical e setorial das ninfas de mosca-branca nas folhas do meloeiro. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.3, p.464-467, 2003.

BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; ROSELL, R.C.; MARKHAM, P.G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. **Annals of Applied Biology**, v.125, p.311–325, 1994.

BEITIA, F.; MAYO, I.; ROBLES-CHILLIDA, E.M.; GUIRAO, P.; CENIS, J.L. Current status of *Bemisia tabaci* (Gennadius) in Spain: the presence of biotypes og this species. **IOBC/WPRS Bulletin** 20, v.4, p.99-107, 1997.

BELKHIR, K.; BORSA, P.; CHIKHI, L.; RAUFASTE, N.; BONHOMME, F. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France), 1996-2004.

BILLOTTE, N.; LAGODA, P.J.L.; RISTERUCCI, A.M.; BAURENS, F.C. Microssatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, v.54, p.277-288, 1999.

BIRD J. A whitefly-transmitted mosaico of *Jatropha Gossypifolia.* **Agric.Exp. Sin. Univ. P. R**. v.22, p.1-35, 1957.

BONDAR, G. Aleyrodideos do Brasil. **Boletim Laboratório Pathologia e Veterinária do Estado da Bahia** , v.5, p. 1-37, 1928.

BROWN, J.K.; BIRD, J. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. **Plant Disease**, v.76, p.220-225, 1992.

BROWN, J.K. The status *of Bemisia tabaci (*Genn.) as a pest and vector in world agroecosystems, **Food and Agriculture Organization of the United Nations Plant Protection Bulletin***, v.*42, p.3-32, 1994.

BROWN, J.K.; FROHLICH, D.R.; ROSELL, R.C. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? **Annual Review of Entomology**, v.40, p.511-534, 1995.

BROWN, J.K.. The Molecular Epidemiology of Begomoviruses, pp. 279-316 In J. A. Khan and J. Dykstra [eds.] Trends in Plant Virology. The Haworth Press, Inc., NY. 2001

BROWN, J.K.; DENNEHY, T.J.; DeGAIN, B.; ROGAN, D.; HASPOLD, G. **First report of the Q biotype of *Bemisia tabaci* (Gennadius) in the USA and resistance to insecticides in an Arizona population.** Avaiable from http://www.whitefly.org/whiteflyforum/forum_post.asp?TID=32&PN=1, 2005.

BUTLER, J.R.; HENNEBERRY, G.D.; CLAYTON, T.J.; T.E. *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae): development, oviposition, and longevity in relation to temperature. **Annals of the Entomological Society of America**, v.76, n.2, p.310-313, 1983.

BUTLER Jr, G.D.; WILSON, F.D.; FISHLER, G. Cotton leaf trichomes and populations of *Empoasca lybica* and *Bemisia tabaci*. **Crop Protection**, v.10, p.461-464, 1991.

BYRNE, D.N.; BELLOWS, T.S.Jr. Whitefly biology. **Annual Review of Entomology**, v.36, p.431-457, 1991.

BYRNE, D.N.; BEDFORD, I.D.; DEVONSHIRE, A.L.; MARKHAM, P.G. Esterease variation and squash silverleafing induction in B-type *Bemisia tabaci* (Gennadius). **Bulletin of Entomological Research**, v.85, p.175-179, 1995.

BYRNE, D.N. Migration and dispersal by the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. **Agricultural and Forest Meteorology** , v.97, p.309–316, 1999.

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**, v.90, p.391-396, 2000.

CHANT, S.R. Studies on the transmission of cassava mosaic virus by *Bemisia* spp. (Aleyrodidae). **The annals of Applied Biology**, v.46, n.2, p.210-215, 1958.

CLARIDGE, M.F.; DAWAH, H.A.; WILSON, M.R. **Species: the units of biodiversity**. London: Chapman & Hall, 1997.

COELHO, A.S.G. BOOD: Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap, Versão 3.0. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO. 2001

COCK, M.J.W. ***Bemsia tabaci*: a literature survey on the cotton whitefly with an annotated bibliography**. Ascot: FAO\CAB, 1986, 121p.

COSTA, A.S. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. **Plant Protection Bulletin,** v.13, p.1-12, 1965.

COSTA, A.S.; COSTA, C.L.; SAUER, H.F.G. Surto de mosca-branca em culturas do Paraná e São Paulo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.2, p.20-30, 1973.

COSTA, A.S.; RUSSELL, L.M. Failure of *Bemisia tabaci* on breed on cassava plants in Brazil (Homoptera: Aleyrodidae). **Ciência e Cultura**, v.27, n.4, p.388-390, 1975.

COSTA, A.S. Comparação de machos e fêmeas de *Bemisia tabaci* na transmissão do mosaico dourado do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.1, p. 99-103, 1976.

COSTA, H.S.; BROWN, J.K. Variation in biological characteristics and esterases patterns among populations of *Bemisia tabaci*, and the association of one population with silverleaf symptom induction. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.61, n.3, p.211-219, 1991.

COHEN, S.; DUFFUS, J.E.; LIU, H.Y. A new *Bemisia tabaci* biotype in the Southwestern United States and its role in silverleaf of squash and transmission of lettuce infections yellow virus. **Phytopathology**, v.82, p.86-90, 1992.

COURNET, J.M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for inferring recent populations bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v.144, p.2001-2014, 1996.

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 of Entomology**, v.36, p.149-152, 1997.

DE BARRO, P.J.; DRIVER, F.; TRUEMAN, J.W.H.; CURRAN, J. Phylogenetic relationship of world populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) using ribosomal ITSI. **Molecular Phylogenetics and Evolution,** v.16, p.29-36, 2000.

DE BARRO, P.J.; HART, P.J. Mating interactions between two biotypes of the whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Australia. **Bulletin of Entomologycal Research**, v.90, p.103-112, 2000.

DE BARRO, P.J.; SCOTT, K.D.; GRAHAM, G.C.; LANGE, C.L.; SCHUTZE, M.K. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Bemisia tabaci*. **Molecular Ecology Notes**, v.3, p.40-43, 2003.

DE BARRO, P.J. Genetic structure of the whitefly *Bemisia tabaci* in the Ásia-Pacific region revealed using microsatellite markers. **Molecular Ecology**, v.14, p.3695-3718, 2005.

DE BARRO, P.; KHAN, S. Adult *Bemisia tabaci* biotype B can induce silverleafing in squash. **Bulletin of Entomological Research,** v.97, p.433-436, 2007.

DELATTE, H.; REYNAUD, B.; GRANIER, M.; THORNARY, L.; LETT, J.M.; GOLDBACH, R.; PETERSCHMITT, M. A new silverleaf-inducing biotype Ms of *Bemisia tabaci* (Hemiptera, Aleyrodidae) indigenous to the islands of the south-west Indian Ocean. **Bulletin of Entomological Research,** v.95, p.29-35, 2005.

DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A.L. Produção de feijão. Guaíba: **Agropecuária,** v.2, p.19-20, 2000.

DROESBEKE, J.J.; FINE, J. Analisis en compoenentes principales. In: II Seminario de capacitacion de docentes. 1995. Bruxelles. **Anais…** Bruxelles: Universidade Central de Venezuela. 1995.

DUFFUS, J.E. Whitefly transmission of plant viruses. In: HARRIS, K.F., ed. Current topics in vector research. New York: Springer-Verlag, 1987, v.4, p.73-91.

EICHELKRAUT, K.; CARDONA, C. Biologia, cria missal y aspectos ecológicos de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae), como plaga del frijol común. **Turrialba**, v.39, n.1, p.55-62, 1989.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, n.14, p.2611–2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v.131, p.479–491, 1992.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. Inglaterra: Longman Group Ltd,. 1989. 312p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D**. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA –CENARGEN, 1998. 220 p.

FONTES, F.v.H.M.; COLOMBO, C.A.; LOURENÇÃO, A.L. Caracterização molecular e divergência genética de Bemisia tabaci (Genn.)(Hemíptera: Aleyrodidae) em diferentes culturas e locais de cultivo. **Neotropical Entomology**, v.39, n.2, p.221-226, 2010.

FRANÇA, F.H.; BÔAS, G.L.V.; BRANCO, M.C. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleroydidae) no Distrito Federal. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.25, p.369-372, 1996.

FROHLICH, D.R.; TORRES-JEREZ, I.; BEDFORD, I.D.; MARKHAM, P.G.; BROWN, J.K. A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. **Molecular Entomology**, v.8, p.1683-1691, 1999.

FUTUYMA, D. J. **Evolutionary Biology**, 3.ed. Sunderland: Sinauer Associates. 1998.

FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 1993. 631p.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. 3.ed. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GENNADIUS, P. Disease of the tobacco plantations in the Trikonia. The aleurodid of tobacco. **Ellenike Ga**. v.5, p.1-3, 1889.

GERLING, D.; HOROWITZ, A.R.; BAUMGAERTNER, J. Autoecology of *Bemisia tabaci*. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.17, n.1/2, p.5-19, 1986.

GERLING, D. Una reinterpretación sobre las moscas blancas. **Manejo integrado de Pragas**, v.63, p.13-21, 2002.

GUIRAO, P.; BEITIA, F.; CENIS, J.L. Biotype determination in Spanish populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) **Bulletin of Entomological. Research,** v.87, p.587–593, 1997.

HEQUET, E.; ABIDI, N. Processing sticky cotton: Implication of trehalulose in residue build-up. **The Journal of Cotton Science**. v.6, p.77-90, 2002

HAJI, F.N.P.; LIMA, M.F.; ALENCAR, J.A.; PREZOTTI, L. Mosca-branca: nova praga na região do submédio São Francisco. **Horticultura Brasileira**, v.14, p.88, 1996.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDERO, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, v.137, 1121–1137, 1994.

HAMRICK, J.L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, v.69, p.1685-1693, 1982.

HOROWITZ, A.R.; DENHOLM, I.; GORMAN, K.; CENIS, J.L.; KONTSEDALOV, S.; ISHAAYA, I. Biotype Q of *Bemisia tabaci* Identified in Israel. **Phytoparasitica,** v.31, p.94-98, 2003.

JONES, D.R. Plant viruses transmitted by whiteflies. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p.195-219, 2003.

LENTEREN, J.C.van; NOLDUS, L.P.J.J. **Whitefly – plant relationships: behavioral and ecological aspects**. In: GERLING, D. (Ed.). Whiteflies: their bionomics, pest status and management. Andover, UK: Intercept, 1990. p.47-89.

LIMA, L.H.C.; NÁVIA, D.; INGLIS, P.W.; OLIVEIRA, M.R.V. Survey of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidade) biotypes in Brazil using RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, 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, n.2, p.217-223, 2002.

LOURENÇÃO, A.L.; NAGAI, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. **Bragantia**, v.53, p.53-59, 1994.

LOURENÇÃO, A.L.; YUKI, V.A.; ALVES, S.B. Epizootia de *Aschersonia* cf. *goldiana* em *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) biótipo B no Estado de São Paulo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.28, p.343-345, 1999.

LOURENÇÃO, A.L.; MIRANDA, M.A.C.; ALVES, S.B. Ocorrência epizoótica de *Verticillium lecanii* em *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) no estado do Maranhão. **Neotropical Entomology**, v.30, p.183-185, 2001.

LOURENÇÃO, A.L.; SOUSA-DIAS, J.A.C.; FUGI, C.G.Q. Mosca-branca: superpraga da agricultura mundial ameaça a bataticultura brasileira. **Batata Show**, v.6, p.7-8, 2003.

LYNCH, R.E.; SIMMONS, A.M. Distribution of immatures and monitoring of adult sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) in peanut, *Arachis hypogaea*. **Environmental Entomology**, v.22, n.2, p.375-380, 1993.

MANLY, B.F.J. **Multivariate statistical methods**. London:Chapman and Hall.1986.

MAYNARD, D.N.; CANTLIFFE, D.J. Squash silverleaf and tomato irregular ripening: new vegetable disorders in Florida. **Vegetable Crops Fact Sheet**, Florida Cooperative Extension Service Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, Florida, 1989.

MOND, L.A.; HALSEY, S.H. **Whitefly of the world: a systematic catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with host plant and natural enemy data**. London British Museum (Natural History): John Wiley & Sons, Chichester, 1978. 340p.

MORRISON, D.F. **Multivariate statistical methods**. New York:McGraw-Hill. 1976.

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**, v.10, p.891–897, 2001.

NAGAI, H.; LOURENÇÃO, A.L.; VEGA, J.; MELO, A.M.T. Ocorrência da "folha prateada de aboboreira" associada à mosca branca (*Bemisia tabaci*). **Horticultura Brasileira**, v.10, p.62, 1992.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.89, p.583-590, 1978.

NUCCI, S.M.; AZEVEDO-FILHO J.A.; COLOMBO C.A.; PRIOLLI R.H.G.; COELHO R.M.; MATA T.L.; ZUCCHI M.I. Development and characterization of microssatellites markers from the Acrocomia aculeata. **Molecular Ecology Notes**, Online Early Articles, Published article online: 15-Aug-2007, doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01932.x.

OLIVEIRA, M.R.V.; SILVA, O.L.R. Mosca-branca *Bemisia argentifolii* (Hemiptera, Aleyrodidae) e sua ocorrência no Brasil. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal, (Alerta Fitossanitário, 1) 16p., 1997.

OLIVEIRA, M.R.V.; HENNEBERRY, T.J.; ANDERSON, P. History, current status and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. **Crop Protection**, v.20, p.709-723, 2001.

OSBOURNE, L.S. Summary of Q biotype survey data. Bemisia website http://mrec.uufl.edu/LSO/bemisia/bemisia.htm, 2005.

PEMBERTON, J.M.; SLATE, J., BANCROFT, D.R.; BARRETT, J.A. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. **Molecular Ecology**, v.4, **p.**249-252, 1995.

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

PERRING, T.M. The *Bemisia tabaci* species complex. **Crop Protection**, v.20, p. 725-737, 2001.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, n.155, p.945 – 959, 2000.

RAMOS, L.J.; BHARANTHAN, N.; MCMILLAN, R.T.; NARAYANAN, K.R. Histopathological changes associated with silverleaf syndrome in squash. **Plant Pathology**, v.44, p.316-324, 1995.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. Genepop version 2.0: population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.

ROLF, F.J. **NTSYS-Pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: Exeter Publisher, 1989. 210p.

RONDA, M.A.; ADAN, A.; CIFUENTES, D.; CENIS, J.L.; BEITIA, F. Laboratory evidence of interbreeding between biotypes of Bemisia tabaci (Homoptera, Aleyrodidae) present in Spain. pp. 83–84 in V11th International plant virus epidemiology symposium – Plant virus epidemiology: current status and future prospects 1999 . Aguadulce, Spain.

ROSELL, R.C.; BEDFORD, I.D.; FROHLICH, D.R.; GILL, R.J.; MARKHAM, P.G.; BROWN, J.K. Analyses of morphological variation in distinct populations of *Bemisia tabaci*. **Annals of the Entomological Society of America**, v.90, p.575-589, 1997

RUSSELL, L.M. Synonyms of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). **Bulletin of the Brooklyn Entomological Society**, v.52, p.122-23, 1957.

SIMON, B.; CENIS, J.L.; DE LA RÚA, P. Distribution patterns of the Q and B biotypes of *Bemisia tabaci* in the Mediterranean Basin based on microsatellite variation. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.124:327-336, 2007.

SILVEIRA, C.A.; ALBERT Jr, I.B. Uma nova espécie de mosca branca preocupa a agricultura brasileira. **Correio Agrícola**, n.1, p.10-13, 1997.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**. San Francisco: Freeman, 1973.

SOUZA, A.P.; VENDRAMIM, J.D. Efeito de extratos aquosos de meliáceas sobre *Bemisia tabaci* biótipo B em tomateiro. **Bragantia**, v.59, n. 2, p.153-159, 2000.

SOUZA-DIAS, J.A.C.; SAWAZAKI, H.E. Herança hereditária. **Revista Cultivar**, ed. 26, p.19-22, 2004.

SOSA-GOMEZ, D.R.; MOSCARDI, F.; SANTOS, M. *Bemisia* ssp. na cultura da soja: ocorrência, controle químico e incidência do fungo entomopatogênico *Paecilomyces ssp*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16, 1997, Salvador, p.144.

SOUZA-DIAS, J.A.C.; YUKI, V.A.; RIBEIRO, S.G.; RAVAGNANE, V.A. Tomato yellow vein streak is caused by a geminivirus that infects potato plants. **Summa Phytopathologica**, v. 22, p.57, 1996.

SUGANUMA, E. & CIAMPI, A. Y. Análise genética populacional de jatobá (Hymenaea ssp Leguminosaea) utilizando microssatélites, 2001. http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/03/03pdf/03-007.pdf. (13 fevereiro 2005).

SSERUWAGI, P.; LEGG, J.P.; MARUTHI, M.N.; COLVIN, J.; REY, M.E.C.; BROWN, J.K. Genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera, Aleyrodidae) populations and presence of the B biotype and a non-B biotype that can induce silverleaf symptoms in squash, in Uganda. **Annals of Applied Biology**, v**.**147, p. 253-265, 2005.

TAMAI, M.A.; MARTINS, M.C.; LOPES, P.V.L.; OLIVEIRA, A.C.B. Perda de produtividade em cultivares de soja causada pela mosca-branca no cerrado baiano. **Comunicado Técnico**, v.21, 2006.

TSAGKARAKOU, A.; RODITAKIS, N. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Molecular Ecology Notes**, v.3, p.196–198, 2003.

TSAGKARAKOU, A.; TSIGENOPOULOS, C.S.; GORMAN, K.; LAGNEL, J.; BEDFORD, I.D. Biotype status and genetic polymorphism of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Greece: mitochondrial DNA and microsatellites. **Bulletin of Entomological Research**, v.97, p. 29–40, 2007.

VALLE, G.E.; LOURENÇÃO, A.L.; NOVO, J.P.S. Controle químico de ovos e ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Scientia Agricola**, v.59, p.291-294, 2002.

VALLE, G.E.; LOURENÇÃO A.L. Resistência de genótipos de soja a *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Neotropical Entomology**, v.31, p.285-295, 2002.

VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. Viçosa: UFV, 1998. 596p.

VILLAS BÔAS, G.L.; FRANÇA, F.H.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C. **Manejo integrado da mosca-branca *Bemisia argentifolii*.** Brasília: EMBRAPA-CNPH, Circular Técnica 9, 1997. 11p.

WANG, K.; TSAI, J.H. Temperature effect on development and reproduction of silverleaf whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). **Annals of Entomological Society of America**, v.89, n.3 p.375-384, 1996.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary *primers*. **Nucleic Acides Research**, v.18, p. 7213-7218, 1990.

WEIR, B.S. **Genetic Data Analysis II - Methods for Discrete Population Genetic Data**. Sinauer Associates, Sunderland, 1996.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. **Evolution**, v. 19, p. 395-420, 1965

YOKOMI, R.K.; HOELMER, K.A.; OSBORNE, L.S. Relationship between the sweetpotato whitefly and the squash silverleaf disorder. **Phytopathology**, v.80, p.895-900, 1990.

YUKI, V.A.; A.L. LOURENÇÃO; H. KUNIYUKI; BETTI, J.A. Transmissão experimental do vírus do mosaico dourado do feijoeiro por *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil,** v. 27, p. 675-78, 1998.

YUKI, V.A.; NOVAES, Q.S.; SÃO JOSÉ, A.R.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W. Colonização de *Bemisia tabaci* (Genn) (Hemiptera: Aleyrodidae) em maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. flavicarpa) e transmissão de um geminivírus. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 19, Manaus. Resumos. p.316, 2002.

ZHANG, L.P.; ZHANG, Y.L.; ZHANG, W.J.; WU, Q.J.; XU, B.Y.; CHU, D. Analysis of genetic diversity among different geographical populations and determination of biotypes of *Bemisia tabaci* in China. **Journal of Aplied Entomology**, v. 129, p.121-128, 2005.

7 Anexo

Anexo I – Artigo: FONTES, F.v.H.M.; COLOMBO, C.A.; LOURENÇÃO, A.L. Caracterização molecular e divergência genética de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) em diferentes culturas e locais de cultivo. **Neotropical Entomology**, v.39, n.2, p.221-226, 2010.

SYSTEMATICS, MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY

Caracterização Molecular e Divergência Genética de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) em Diferentes Culturas e Locais de Cultivo

Fernanda von H M Fontes[1], Carlos A Colombo[2], André L Lourenção[1]

[1]*Centro de Fitossanidade;* [2]*Centro de Genética. Instituto Agronômico (IAC), CP 28, 13001-970 Campinas, SP, Brasil; fervhmf@gmail.com; ccolombo@iac.sp.gov.br; andre@iac.sp.gov.br*

Edited by Fernando L Cônsoli – ESALQ/USP

Neotropical Entomology 39(2):221-226 (2010)

Molecular Characterization and Genetic Divergence of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) on Different Crops and Growing Areas

ABSTRACT - Knowledge on the genetic variation of populations of *Bemisia tabaci* (Genn.) can improve the understanding of genetic diversity found in their biotypes and, consequently, offer guidelines for its management. In this study, the molecular characterization was performed and genetic diversity data were obtained for this insect from three regions of Brazil on different crops [cotton and soybean (Mato Grosso – MT); cabbage (Distrito Federal – DF); soybean and potato (São Paulo – SP)], using RAPD markers. RAPD analysis indicated 80.6% polymorphic loci and the average genetic similarity obtained by the Jaccard coefficient was 0.67. The whitefly populations collected on potato (SP) and soybean (MT) had higher genetic diversity values (0.75 and 0.72, respectively). Shannon's index (Ho) showed higher values for potato and soybean (SP e MT), and a smaller value for cabbage (DF). A high genetic divergence within and among the collected populations occurred, structured according to the regions of collection. Moreover, the great genetic similarity observed between potato (SP) and soybean (SP) populations suggested that both belong to the same biotype B and reinforces the polyphagous behavior of the species.

KEY WORDS: Silverleaf whitefly, RAPD-PCR, biotype, genetic diversity, squash silvering

No Brasil, o primeiro relato de *Bemisia tabaci* (Genn.) data da década de 20, na Bahia, sendo citada a ocorrência do inseto em baixos níveis de infestação (Bondar 1928). Décadas mais tarde, ocorreram surtos populacionais no Norte do Paraná e na região de Ourinhos (SP) (Costa *et al* 1973). Após essas constatações, surtos populacionais de mosca-branca no Brasil deram-se apenas no início dos anos 90 em plantas ornamentais e em lavouras de tomate e abóbora, no estado de São Paulo. De acordo com Lourenção & Nagai (1994), os insetos ocorrendo nessas culturas pertenciam ao biótipo B, que se caracteriza, entre outros fatores, por possuir maior quantidade de plantas hospedeiras, resistência a diversos inseticidas e capacidade de induzir desordens fisiológicas a certos tipos de hospedeiros, como o prateamento da folha da aboboreira e o amadurecimento irregular dos frutos do tomateiro (Costa & Brown 1991, Brown 2000). Posteriormente, a praga disseminou-se pelas principais áreas agrícolas do país (Haji *et al* 1996, França *et al* 1996), e há relatos da sua ocorrência em muitos estados brasileiros, levando a perdas estimadas que atingem até 100% em algumas culturas e cujos prejuízos somam alguns bilhões de dólares (Ferreira & Avidos 1998).

As espécies de mosca-branca são identificadas pela taxonomia convencional ou clássica, a qual tem se mostrado ineficaz para a separação dos diferentes biótipos reconhecidos para esse inseto, uma vez que dentro do complexo *B. tabaci* as estruturas morfológicas são muito semelhantes. Técnicas moleculares têm sido desenvolvidas e utilizadas no mundo todo, facilitando a separação dos biótipos de forma rápida e segura. Atualmente, há registros de mais de 24 biótipos no mundo, sendo que essa grande variabilidade sugere que *B. tabaci* seja um complexo de espécies ou de biótipos (Brown *et al* 1995, Frohlich *et al* 1999, Perring 2001) que podem ser identificados pelo uso de izoenzimas, reações específicas de fitotoxicidade e marcadores moleculares (Perring 2001).

A correta identificação de biótipos de *B. tabaci* é de suma importância para seu manejo adequado, uma vez que dentre os vários biótipos já caracterizados, há aqueles que têm maior importância agrícola, como o B e o Q (Simón *et al* 2007), e que podem apresentar diferenças na resistência aos inseticidas normalmente usados para seu controle (Horowitz *et al* 2003).

Os marcadores moleculares permitem gerar uma grande quantidade de informações sobre diversidade genética e relações filogenéticas dos indivíduos analisados, sendo que o grande número disponível destes marcadores permite uma amostragem extensiva dos genomas de interesse em nível de DNA, sem influência do ambiente (Ferreira & Grattapaglia

1996). Por essas razões, estão sendo muito utilizados no reconhecimento de biótipos da mosca-branca *B. tabaci*, que pode ser realizado por meio das técnicas de RAPD, AFLP, SSR e polimorfismo de DNA mitocondrial e ribossômico (Guirao *et al* 1997, Cervera *et al* 2000, De Barro *et al* 2000, De Barro 2005). As análises feitas por RAPD têm se mostrado eficazes no reconhecimento de variabilidade dentro do complexo *B. tabaci*, a exemplo do trabalho desenvolvido por Lima *et al* (2002), que caracterizaram diferentes populações brasileiras de mosca-branca por meio desse marcador molecular. Além disso, é um método que requer pequena quantidade de DNA proveniente de material que pode ser preservado em álcool, tem baixo custo e é relativamente simples e rápido, além de ser possível utilizar cada indivíduo em qualquer estágio de desenvolvimento (Perring *et al* 1993, Abdullahi *et al* 2003).

Para Gerling (2002), tanto a distribuição geográfica quanto o uso de diferentes plantas hospedeiras podem levar ao surgimento de diferenças alopátricas. Fatores genéticos como arrenotoquia e as atividades humanas que proporcionam grande quantidade de alimentação homogênea e estável (monoculturas, muito disseminadas no Brasil), em associação com a pressão de seleção do ambiente pelo uso indiscriminado de inseticidas, podem contribuir para a rápida especialização e posterior especiação em moscas-brancas. O conhecimento sobre a variação genética entre as populações de mosca-branca é, portanto, de grande interesse para o controle e manejo mais eficientes (Lima *et al* 2002).

Em batata (*Solanum tuberosum*), a ocorrência de mosca-branca é conhecida há vários anos, mas suas populações sempre foram pequenas, não causando graves danos às plantas (Mound & Halsey 1978, Gallo *et al* 2002). Altas infestações do biótipo B de *B. tabaci* em lavouras de batata são recentes, tendo sido constatados os primeiros surtos populacionais apenas a partir de 2001 (Lourenção *et al* 2003).

No presente trabalho, os objetivos foram obter a caracterização molecular de populações de *B. tabaci* que vêm ocorrendo em diferentes culturas, especialmente a batata, consideradas suspeitas de diferirem do biótipo B, e analisar a diversidade genética intra e interpopulacional dos materiais coletados, por meio da técnica de RAPD-PCR.

Material e Métodos

Moscas-brancas utilizadas. O material de estudo foi representado por 60 insetos adultos coletados em diversas culturas e locais (Tabela 1). Os insetos coletados foram armazenados em etanol a 92% e mantidos a 4ºC até sua utilização.

Teste de prateamento da folha de aboboreira. Para as moscas-brancas de Campinas (SSP), foi realizado um teste de prateamento da folha de aboboreira para confirmar se a população pode ser o biótipo B, uma vez que esse biótipo induz essa desordem fisiológica (Brown *et al* 1995), causada pela introdução de substâncias tóxicas pelas ninfas da mosca-branca (Byrne & Bellows 1991). Para tanto, a infestação foi feita com a liberação de adultos do inseto criados em soja, em dois vasos contendo, cada um, uma muda de aboboreira (*Cucurbita pepo* cv. Styria) com a primeira folha verdadeira completamente desenvolvida. A planta foi coberta por gaiola plástica, com tampa telada, para evitar a fuga dos insetos. Um terceiro vaso, contendo muda de aboboreira, foi mantido protegido também por gaiola, sem infestação por *B. tabaci*, servindo como controle.

Tabela 1 Plantas hospedeiras e localidades das coletas das populações de *Bemisia tabaci*, seguidos pelo respectivo código de identificação e número de indivíduos utilizados nas análises moleculares.

Planta hospedeira	Localidade	Código	Nº indivíduos
Algodão	Rondonópolis (MT)	AMT	11
Soja	Rondonópolis (MT)	SMT	13
Soja	Campinas (SP)	SSP	13
Repolho	Brasília (DF)	RDF	10
Batata	Monte Mor (SP)	BSP	13

Obtenção do DNA total. Amostras representadas por um indivíduo adulto foram colocadas em microtubos de 1,5 ml, maceradas em 60 µl de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,3%, proteinase K 60 µg/ml) e incubados a 65ºC por 15 min. O homogeneizado foi incubado a 95ºC por 7 min (para a inativação da proteinase K) e congelado imediatamente a -20ºC (Lima *et al* 2002).

RAPD-PCR. Para a obtenção do perfil de amplificação de RAPD, foram realizadas reações de amplificação em volume total de 15 µl, com as seguintes concentrações de reagentes: 1x Buffer PCR; 1,5 mM MgCl2; 200 µM dNTP; 1U Taq DNA polimerase, 0,4 µM do iniciador (Tabela 2) e 10 a 15

Tabela 2 Número de bandas totais e polimórficas obtidas a partir de amplificações de diferentes iniciadores RAPD em *Bemisia tabaci*.

Primers	Número de loci	Loci polimórficos	Polimorfismo (%)
OPA 04	7	6	85,7
OPA 02	6	6	100
OPA 10	4	4	100
OPK 11	5	2	40
OPK 10	5	2	40
OPH 07	3	3	100
OPH 15	6	4	66,6
OPH 18	3	2	66,6
OPAC 08	5	4	80
OPAC 06	7	7	100
OPJ 05	7	6	85,7
OPC 04	6	5	83,3
OPO 01	7	7	100
Média	5,46	4,46	80,6

ng de DNA (aproximadamente 4 µl). A amplificação foi feita no mesmo termociclador, modelo PTC-200 (MJ Research), programado para um ciclo de 3 min a 94ºC, 45 ciclos de 1 min a 93ºC, 1 min a 35ºC, 2 min a 72ºC e um ciclo final de extensão de 5 min a 72ºC. Em continuidade, os produtos da PCR foram mantidos congelados a -20ºC até sua análise por eletroforese em gel de agarose 1,8% em tampão tris-borato-EDTA (TBE). A coloração do gel foi feita com brometo de etídio e os produtos de amplificação visualizados e fotografados contra luz UV. Foi incluído um controle negativo sem DNA em todas as reações.

Análise dos dados. Os produtos amplificados (bandas) foram codificados como presentes (1) ou ausentes (0) para cada indivíduo analisado e os dados apresentados em uma matriz de dupla entrada (indivíduos vs. bandas). A partir dessa matriz, foi calculado um índice de similaridade genética entre todos os indivíduos, comparados dois a dois (S*ij*), utilizando-se o índice de concordância de Jaccard (Sneath & Sokal 1973).

A diversidade genética inter e intrapopulacional das amostras procedentes das diferentes culturas e locais de coleta foi estimada pelo índice de Shannon (Ho). Esse índice foi assim obtido (Lyn & Schall 1989): $Ho = -\sum pi \log pi$, onde *pi* é a frequência fenotípica do marcador. Também foi realizada a análise de variância dos dados moleculares (AMOVA) (Excoffier *et al* 1992), que revela a partição da variação genética total entre e dentro das populações de estudo, utilizando o software *Arlequin* versão 3.1.

A medida de parentesco entre os indivíduos foi baseada em análise multivariada e a partir do índice de similaridade (Jaccard) obtido entre os indivíduos. Dessa forma, a partir dos dados da matriz de similaridade, foi calculado um dendrograma pelo método UPGMA de classificação hierárquica (Método da Média Aritmética não Ponderada). A estabilidade dos agrupamentos foi testada através de 10.000 reamostragens de *bootstrap*.

Resultados

Teste de prateamento da folha de aboboreira. As plantas submetidas à infestação apresentaram os sintomas de prateamento das folhas. Portanto, para as análises moleculares, a população proveniente da cultura de soja do IAC serviu de referência como biótipo B. Essa população vem sendo mantida há vários anos pelo Centro de Fitossanidade do IAC e foi inicialmente identificada pela Dra. Judith K. Brown, Universidade do Arizona, EUA, como pertencente a esse biótipo.

RAPD-PCR. As amplificações RAPD foram feitas com 13 iniciadores e produziram o total de 71 *loci*, dos quais 80,6% apresentaram-se polimórficos, sendo 4,5 o número médio de bandas polimórficas (Tabela 2). O tamanho das bandas amplificadas variou de 300 pb a 1300 pb. Os iniciadores que forneceram maior e menor número de *loci* totais e polimórficos foram OPO 01 e OPAC 06, com sete bandas totais e polimórficas, e OPH-18, sendo que, das três bandas totais amplificadas, duas apresentaram polimorfismo de presença e ausência.

A matriz de dados binários foi base para o cálculo do índice de similaridade genética (Jaccard) entre todos os 60 indivíduos do estudo. O valor médio de similaridade encontrado entre todas as comparações foi de 0,67, inferior ao encontrado por Lima *et al* (2002) que, entre 109 indivíduos de biótipo B, obtiveram similaridade média de 0,73, utilizando cinco iniciadores de RAPD. O maior valor de similaridade encontrado foi entre dois indivíduos da população AMT (0,95) e o menor valor (0,31) entre indivíduos BSP e SMT, que também se distanciaram no dendrograma de populações, clusterizando-se em clados diferentes.

Os menores valores médios de similaridade encontrados dentro de populações foram em soja (SMT) e batata (BSP), com 0,72 e 0,75, respectivamente, enquanto os maiores foram obtidos para as populações de soja do estado de São Paulo (SSP), algodão (AMT) e repolho (RDF), com valores de 0,76, 0,80 e 0,84, respectivamente.

A relação de similaridade genética revelada pelo índice de Jaccard entre os indivíduos do estudo permitiu a construção de um dendrograma (UPGMA) (Fig 1), que mostrou a estruturação da diversidade genética presente nos indivíduos em basicamente dois grandes grupos. O grupo 1 (G1) congregou a maioria dos indivíduos das populações BSP e SSP, enquanto o grupo 2 (G2) os indivíduos das populações SMT, AMT e RDF, o grupo 3 (G3) os de três indivíduos BSP e o grupo 4 (G4) apenas um indivíduo AMT.

A partir dos dados do índice de similaridade de Jaccard obtido para todos os indivíduos, foi calculada a média desses valores dentro e entre populações. A média foi utilizada para a construção de um novo dendrograma (Fig 2), onde a estrutura genética formada é explicada, principalmente, pelos locais de procedência das amostras do estudo.

O resultado da AMOVA revelou que uma porção considerável da variação genética encontra-se entre as populações (21%) e que a maior porcentagem de variação observada no material de estudo ocorre dentro das próprias populações (79%).

O índice de diversidade de Shannon (Ho), que diz respeito à variabilidade intrapopulacional, foi calculado levando-se em conta a frequência fenotípica do marcador. O índice evidenciou a maior taxa de divergência genética entre os insetos presentes nas populações SMT, SSP e BSP, cujos valores encontrados foram de 7,48; 7,37 e 7,26, respectivamente. AMT e RDF apresentaram os menores valores de Ho (6,56 e 5,63, respectivamente), ou seja, os menores índices de divergência genética dentro de suas populações. Os resultados da matriz de similaridade corroboram os dados de Shannon (Ho), onde as três populações com maiores valores de Ho possuem os menores valores de similaridade de Jaccard.

Discussão

Os resultados aqui obtidos demonstraram a variabilidade intra e interpopulacional existente em *B. tabaci* nas regiões e culturas amostradas neste estudo, à semelhança do observado por outros autores (Lima *et al* 2002). Uma das hipóteses para entender a estrutura genética baseada nas regiões geográficas de coleta pode ser atribuída ao hábito migratório

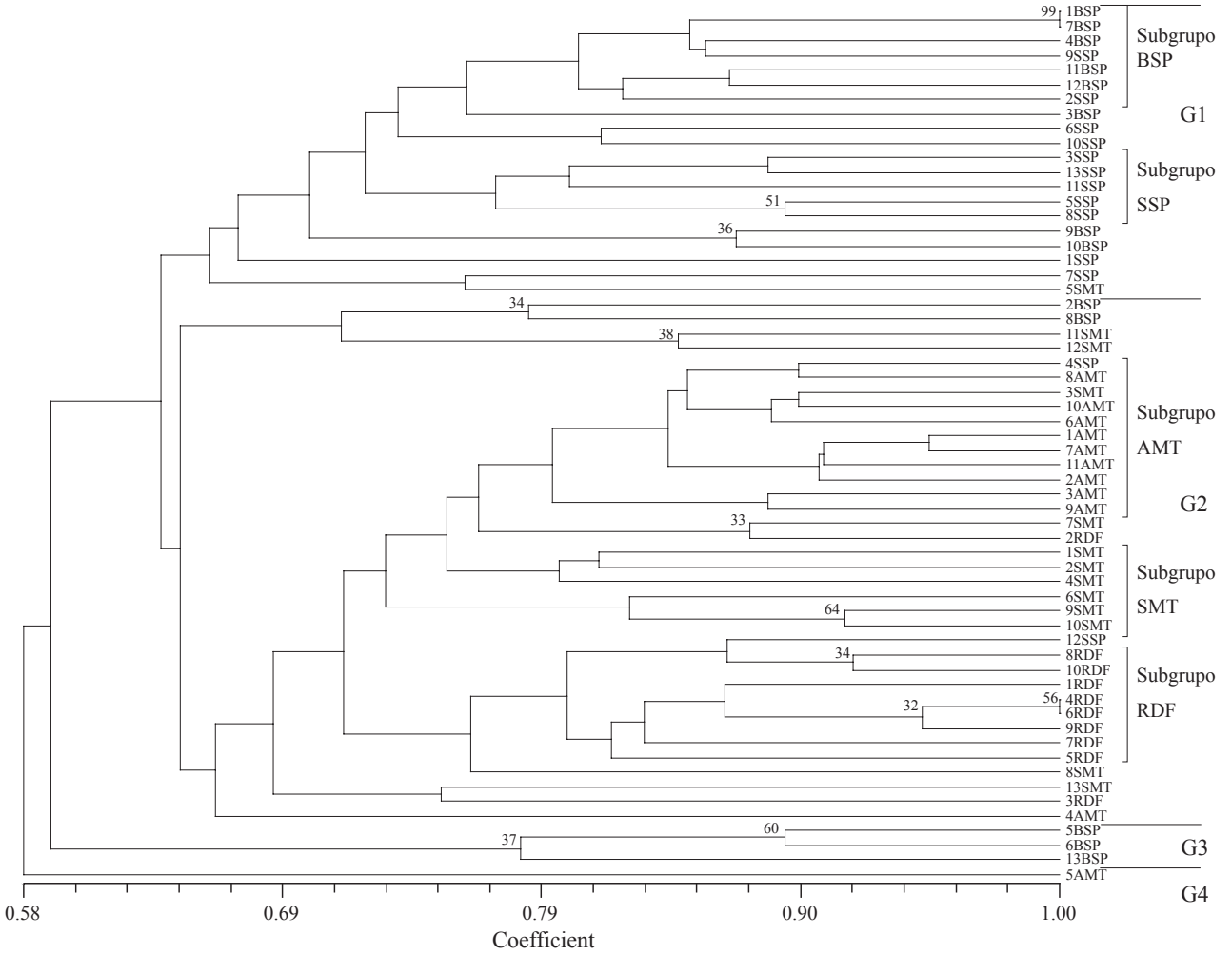

Fig 1 Dendrograma representando a diversidade genética observada em *Bemisia tabaci* de diferentes locais e culturas no Brasil, obtido a partir do índice de similaridade de Jaccard. SSP indivíduos de *B. tabaci* coletados em soja (SP), SMT em soja (MT), AMT em algodão (MT), BSP em batata (SP) e RDF em repolho (DF).

do inseto, que, por sua vez, é consequência de fatores como a deterioração da cultura atacada e/ou a direção do vento, o que os faz migrar para outros campos de cultivos (Villas Bôas *et al* 1997). Segundo Byrne (1999), o maior relato de voo a longa distância por *B. tabaci* foi de 7 km, de maneira passiva, numa corrente de ar. Voos desse tipo facilitam a migração de populações para locais distantes e a consequente colonização de várias outras culturas; assim, pode ocorrer

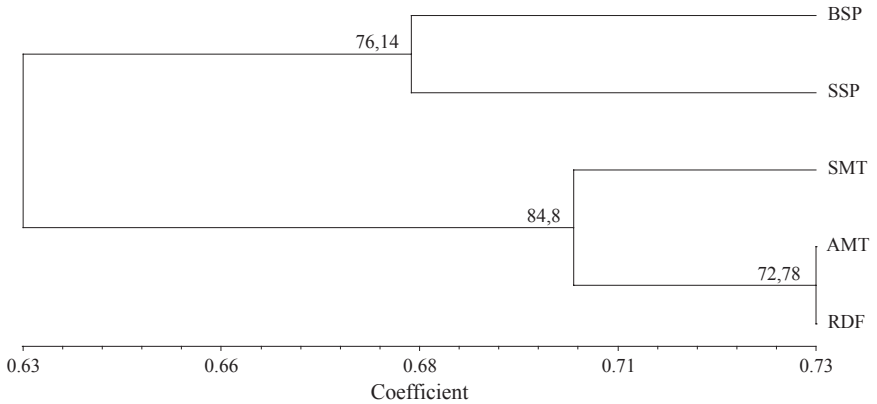

Fig 2 Dendrograma representando a diversidade genética das populações analisadas em conjunto, observada em *Bemisia tabaci,* de diferentes locais e culturas no Brasil, obtido a partir da média do índice de similaridade de Jaccard em SSP, SMT, AMT, BSP e RDF.

fluxo gênico entre as populações, mesmo que elas não estejam tão próximas entre si. Esse parece ser o caso de AMT/SMT e RDF. Apesar da distância existente entre Rondonópolis e Distrito Federal, a facilidade de migração do inseto entre os dois locais provavelmente é maior que do que entre eles e Campinas, uma vez que a região Centro-Oeste é de geografia plana, sem obstáculos que possam inibir tal migração. Isso não ocorre em direção ao estado de São Paulo, pois a Serra da Mantiqueira pode servir de barreira, atuando como fator de divisão dessas populações. Outras explicações para essa clusterização heterogênea podem ser as diferenças entre fatores nutricionais e comportamentais (Lima *et al* 2002) ou o modo de introdução do biótipo B, que pode ter se dado de forma dispersa, e não por uma única população fundadora (Lourenção & Nagai 1994).

Mesmo com a possível ocorrência de migração entre insetos de culturas e regiões próximas, assim como discutido anteriormente, a similaridade média intrapopulacional encontrada foi mais elevada do que a média geral. De acordo com De Barro (2005), isso pode ser devido ao aumento de endocruzamentos na população, o que pode levar à diminuição da variabilidade genética, gerando indivíduos geneticamente mais parecidos.

Um dos objetivos do estudo foi caracterizar insetos de *B. tabaci* ocorrendo em lavouras antes não atacadas, como a cultura da batata, com suspeita de não pertencerem ao biótipo B. Os indivíduos coletados na cultura da batata, no município de Monte Mor (SP), foram em grande parte agrupados com a população SSP. Em outras palavras, a população BSP é geneticamente próxima de SSP e, nesse caso, seria mais provável supor que os insetos que ocorrem na cultura da batata seriam procedentes da cultura da soja. Considerando que a ocorrência da mosca-branca na cultura da batata é relativamente recente, era de se esperar menor divergência genética entre os insetos dessa cultura, o que não ocorreu. Por outro lado, a evidência de alta divergência genética na população BSP poderia ser explicada pela ausência de estrutura genética na população de *B. tabaci* ocorrendo na cultura da soja do estado de São Paulo. Nesse caso, os indivíduos da cultura da soja que, eventualmente, teriam migrado para a cultura da batata, teriam diversidade alélica relativamente alta em relação à população original.

A grande similaridade genética entre BSP e SSP, observada tanto no dendrograma com todos os indivíduos quanto no de populações, enfraquece a hipótese de que *B. tabaci* em batata possa representar um novo biótipo, dado que sua presença nessa cultura, nos níveis atuais de infestação, é relativamente recente. Além disso, como SSP pertence ao biótipo B, como confirmado pelo teste de prateamento, é mais provável que os insetos da população BSP pertençam ao mesmo biótipo. Porém, estudos abrangendo culturas de batata de outras regiões do Brasil, com maiores amostragens populacionais e outros tipos de marcadores moleculares e testes de prateamento, poderiam elucidar melhor a questão.

Como principais inferências, destacam-se alguns aspectos sobre o estudo genético das populações de *B. tabaci*: existe importante divergência genética entre as populações coletadas e dentro delas; a estruturação da diversidade deu-se em função das regiões de coleta (Sudeste e Centro-Oeste); e, por fim, a grande similaridade genética observada entre BSP e SSP sugere que ambas as populações sejam pertencentes ao biótipo B e reforça o comportamento polífago do inseto.

Agradecimentos

À Dra. Geni Litvin Villas Bôas, pelo fornecimento das moscas-brancas do Distrito Federal, à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida ao primeiro autor e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade em pesquisa concedida ao terceiro autor.

Referências

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

Bondar G (1928) Aleyrodideos do Brasil. Bolm Lab Path veg Est Bahia 5: 1-37.

Brown, J K (2000) Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector-begomovirus complexes. Virus Res 71: 233-260.

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

Byrne D N (1999) Migration and dispersal by the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. Agric For Meteorol 97: 309-316.

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

Cervera M T, Cabezas J A, Simon B, Martinez Zapater J M, Beitia F, Cenis J L (2000) Genetic relationships among biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on AFLP analysis. Bull Entomol Res 90: 91-396.

Costa H S, Brown J K (1991) Variation in biological characteristics and esterase patterns among populations of *Bemisia tabaci*, and the association of one population with silverleaf symptom. Entomol Exp Appl 61: 211-219.

Costa A S, Costa C L, Sauer H F G (1973) Surto de mosca-branca em culturas do Paraná e São Paulo. An Soc Entomol Brasil 2: 20-30.

De Barro P J (2005) Genetic structure of the whitefly *Bemisia tabaci* in the Asian-Pacific region revealed using microsatellite markers. Mol Ecol 14: 3695-3718.

De Barro P J, Driver F, Trueman J W H, Curran J (2000) Phylogenetic relationship of word populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) using ribosomal ITSI. Mol Phylogen Evol 16: 29-36.

Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131: 479-491.

Ferreira L T, Avidos M F D (1998) Mosca-branca: presença indesejável no Brasil. Biotecnol Ciênc Desenv 4: 22-26.

Ferreira M E, Grattapaglia D (1996) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília, EMBRAPA – CENARGEN, 220p.

França F H, Bôas G L V, Branco M C (1996) Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleroydidae) no Distrito Federal. An Soc Entomol Brasil 25: 369-372.

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

Gallo D, Nakano O, Silveira N S, Carvalho R P L, Baptista G C, Berti F E, Parra J R P, Zucchi R A, Alves S B, Vendramim J D, Marchini L C, Lopes J R S, Omoto C (2002) Entomologia Agrícola. Piracicaba, FEALQ, 920p.

Gerling D (2002) Una reinterpretación sobre las moscas blancas. Man Integr Plagas 63: 13-21.

Guirao P, Beitia F, Cenis J L (1997) Biotype determination in Spanish populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera:Aleyrodidae). Bull Entomol Res 87: 587-593.

Haji F N P, Lima M F, Alencar J A, Prezotti L (1996) Mosca-branca: nova praga na região do submédio São Francisco. Hortic Bras 14: 88.

Horowitz A R, Denholm I, Gorman K, Cenis J L, Kontsedalov S, Ishaaya I (2003) Biotype Q of *Bemisia tabaci* Identified in Israel. Phytoparasitica 31: 94-98.

Lima L H C, Campos L, Moretzsohn M C, Návia D, Oliveira M R V (2002) Genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) populations in Brazil revealed by RAPD markers. Genet Mol Biol 25: 217-223.

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

Lourenção A L, Sousa-Dias J A C, Fugi C G Q (2003) Mosca-branca: superpraga da agricultura mundial ameaça a bataticultura brasileira. Batata Show 6: 7-8.

Lyn M K, Schall B (1989) Ribossomal-DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*. Evolution 45: 1117-1119.

Mound L A, Halsey S H (1978) Whitefly of the world: a systematic catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with host plant and natural enemy data. London British Museum (Natural History); Chichester, John Wiley & Sons, 340p.

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

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

Simón B, Cenis J L, De La Rúa P (2007) Distribution patterns of the Q and B biotypes of *Bemisia tabaci* in the Mediterranean Basin based on microsatellite variation. Entomol Exp Appl 3: 327-336.

Sneath P H A, Sokal R R (1973) Numerical taxonomy. San Francisco, W.F. Freeman, 573p.

Villas Bôas G L, França F H, Ávila A C, Bezerra I C (1997) Manejo integrado da mosca-branca *Bemisia argentifolii*. Brasília, EMBRAPA-CNPH, 11p.

Received 13/X/08. Accepted 04/I/10.