

MARCELO LOPES DA SILVA

**Análise da Diversidade Genética dos Afídeos *Schizaphis
graminum* (Rondani) e *Metopolophium dirhodum* (Walker)
(Hemíptera: Aphididae)**

Tese apresentada à Coordenação
do Programa de Pós-graduação
em Ciências Biológicas, Área de
concentração em Entomologia, da
Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Curitiba

2005

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não é um produto de esforço individual, pois só tornou-se possível pela ajuda que recebi. São muitas contribuições que transparecem a cada página. Ao revisar esta tese, lembrei com alegria dessas pessoas, com as quais, expresso uma profunda gratidão:

- Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira, do IAPAR, meu orientador, agradeço pelos ensinamentos que recebi. Foram lições sobre a objetividade, lógica e de esforço na pesquisa científica, que se mesclaram com preceitos de coerência, respeito e democracia. Não tenho dúvida de que toda minha atividade profissional, de agora em diante, terá muito da marca desses quatro anos de convívio.

- Dr. Alfredo Otávio Rodrigues de Carvalho, do IAPAR, meu amigo, agradeço por ter sido ele, o responsável pelo início de tudo. O seu entusiasmo contaminador foi essencial para esta jornada ao “mundo das moléculas”.

- Ao Doutorando Hugo Bruno Molinari, de quem recebi a maior ajuda na parte da prática de laboratório, tornando este trabalho possível. Mas, é injusto dizer que esse foi o único modo que sua contribuição se fez presente. Não esqueço do apoio que recebi dele em momentos tortuosos e difíceis e pelos mais produtivos diálogos que tive.

- À Dra. Gabriela Tonet, da EMBRAPA-Trigo, a quem agradeço por ter tornado, com seu trabalho, do capítulo 2 desta tese. Agradeço também ao técnico de laboratório Rafael Bonfante pela coleta, criação e manutenção de colônias de pulgões que foram utilizadas no trabalho e ao Dr. Márcio Só e Silva pelo envio de sementes de trigo.

- Agradeço também ao Dr. José Magid Waquil, da EMBRAPA-Milho e Sorgo, pela colaboração no fornecimento de pulgões.

- Especial agradecimento a uma “aldeia global” que contribuiu neste trabalho, graças à existência dessa maravilha chamada Internet: Dr. Kevin Shufron (USDA), Dr. Donald Peters (Oklahoma State University), Dr. Michael Smith (Kansas State University), Dr. Gagan Lushai (University of Southampton), Stewart Gray (Cornell University) pelo

envio de trabalhos e discussões via e-mail. Ao Dr. David Porter (USDA) e o Dr. Jacob Lage (CIMMYT) pelo envio de material.

- Sou grato ao pesquisador Néelson Fonseca Júnior pelas lições na análise dos dados e aos pesquisadores Luiz Alberto Congrossi Campos e Carlos Roberto Riede, do IAPAR, pelo fornecimento de sementes de trigo para a manutenção das colônias de pulgões. Também, aos pesquisadores Yeshwant Metha e Nei Domiciano do IAPAR pelas caronas nas coletas de campo no Estado do Paraná.

- Agradecimentos especiais às colegas Regina Célia Zonta de Carvalho e Daniela Calado, pela convivência e discussões proveitosas nos intervalos dos árduos trabalhos de laboratório.

- Pelo inestimável auxílio no sequenciamento, agradeço às pesquisadoras Elizabete Keiko Takahashi e Sandra Maria Bellodi Cação.

Pelo apoio e disposição de auxiliar, sou muito grato aos professores coordenadores do curso de Pós-Graduação, durante o período de desenvolvimento desta tese: Lúcia Masutti de Almeida, Mário Antônio Navarro da Silva e Sônia Maria Noemberg Lázari. Este agradecimento também se estende ao Secretário do Curso, Sr. Jorge Silveira dos Santos.

- Aos colegas Laboratório de Biotecnologia do IAPAR: Lucélia, Lúcia, Tiago, Ilara, Alessandra, Luiz Filipe, Pierre, Jane, Cherrimar, Leandro, pela convivência diária; e a Rui e Liliane, pela amizade.

- Ao meu cunhado Alberto Plentz Filho, pelo inestimável auxílio em deixar-me utilizar a estrutura do seu escritório na revisão final da tese.

- A minha noiva Rosa, pelo compartilhamento constante de bons e maus momentos, dedicação, amor e, se não bastasse isso, pela ajuda extra na coleta de pulgões. Aproveito para lhe pedir desculpas pela falta de romance que o frio e a lama nos proporcionaram em alguns desses momentos.

- A minha família, pelo equilíbrio emocional nesses quatro anos de muita ausência no convívio.

M. L. S.

Cruz Alta, janeiro de 2005.

SUMÁRIO

Agradecimentos	i
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas.....	vii
Prefácio.....	xi
Capítulo 1: Caracterização de biótipos em insetos, com especial referência aos afídeos...	1
Resumo.....	2
Abstract.....	3
1.1 Conceito de biótipo.....	4
1.2 Conceito de raça hospedeiro-especialista.....	5
1.3 Critérios para detecção de raças hospedeiro-especialista.....	6
1.4 Ocorrência e importância de biótipos de insetos na agricultura.....	8
1.5 Ciclo de vida e ocorrência de biótipos em afídeos (Aphidoidea).....	10
1.6 Estudos moleculares em biótipos de afídeos.....	13
Literatura citada.....	15
Capítulo 2: Caracterização e similaridade genética entre biótipos de <i>Schizaphis graminum</i> (Rondani) (Hemíptera:Aphididae) que ocorrem no Brasil usando marcadores RAPD.....	23
Resumo.....	24
Abstract.....	25
2.1 Introdução.....	26
2.1.1 Ciclo de vida.....	26
2.1.2 Histórico da caracterização dos biótipos de <i>S. graminum</i>	27
2.1.3 Ocorrência de biótipos de <i>S. graminum</i> no Brasil.....	29
2.1.4 Genética da virulência de <i>S. graminum</i>	30
2.1.5 Endosimbiontes e virulência.....	30
2.1.6 Estudos moleculares com RAPD em <i>S. graminum</i>	31
2.2 Objetivos.....	32
2.3 Material e Métodos.....	32

2.3.1 Obtenção de linhagens clonais.....	32
2.3.2 Identificação dos biótipos e conservação das amostras.....	32
2.3.3 Extração do DNA.....	36
2.3.4 RAPD.....	36
2.3.5 Análise dos dados.....	37
2.4 Resultados e discussão.....	37
2.4.1 Identificação dos biótipos.....	37
2.4.2 Relações Genéticas.....	37
2.4.3 Análise da variância molecular (AMOVA).....	45
2.5 Conclusões.....	47
2.6 Literatura citada.....	48
Capítulo 3: Estudo da diversidade genética temporal de <i>Schizaphis graminum</i> por (Hemíptera: Aphididae) por meio de marcadores RAPD.....	53
Resumo.....	54
Abstract.....	55
3.1 Introdução.....	56
3.2 Objetivo.....	57
3.3 Material e métodos.....	58
3.3.1 Coleta.....	58
3.3.2 Multiplicação e conservação dos clones.....	58
3.3.3 Extração do DNA.....	59
3.3.4 RAPD.....	61
3.3.5 Análise dos dados.....	61
3.4 Resultados e discussão.....	62
3.5 Conclusões.....	70
Literatura citada.....	70
Capítulo 4: Análise da diversidade genética de linhagens clonais de <i>Metopolophium dirhodum</i> Walk. (Hemíptera: Aphididae) por marcadores RAPD.....	74
Resumo.....	74
Abstract.....	75
4.1 Introdução.....	77

4.1.1. Bionomia de <i>M. dirhodum</i>	77
4.1.2 Defesas químicas de cereais a biologia dos afídeos.....	79
4.2 Objetivos.....	81
4.3 Material e Métodos.....	81
4.3.1 Obtenção e multiplicação dos clones.....	81
4.3.2 Extração de DNA.....	81
4.3.3 RAPD.....	82
4.3.4 Análise dos dados.....	84
4.4 Resultados e discussão.....	85
4.4.1 Variabilidade genética.....	85
4.4.2 Correlação entre dissimilaridade genética e distância geográfica.....	90
4.4.3 Análise da Variância Molecular (AMOVA).....	93
4.4 Conclusões.....	94
Literatura citada.....	94
Capítulo 5: Variação no segundo espaçador interno transcrito (ITS2) em linhagens clonais de <i>Metopolophium dirhodum</i> Walk. (Hemiptera: Aphididae).....	100
Resumo.....	101
Abstract.....	102
5.1 Introdução.....	103
5.1.1 Caracterização da estrutura do DNA ribossomal.....	103
5.2 Objetivos.....	107
5.3 Material e métodos.....	107
5.3.1 Seleção das linhagens clonais.....	107
5.3.2 Extração do DNA.....	107
5.3.3. Reações de PCR para a amplificação da região ITS.....	108
5.3.4 Clonagem e sequenciamento.....	108
5.3.5 Análise dos dados.....	111
5.4 Resultados e discussão.....	112
5.4.1 Tamanho, composição e diversidade do ITS2.....	112
5.4.2 Análise filogenética das linhagens clonais.....	120
5.5 Conclusões.....	122

Literatura citada.....	126
------------------------	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Perfis eletroforéticos RAPD dos biótipos B, C e E de <i>Schizaphis graminum</i> obtidos com o iniciador OPA-3.....	42
Figura 2.2. Perfis eletroforéticos RAPD dos biótipos B,C e E de <i>Schizaphis graminum</i> obtidos com o iniciador OPA-7.....	42
Figura 2.3. Perfis eletroforéticos RAPD dos biótipos C e E de <i>Schizaphis graminum</i> obtidos com o iniciador OPC-2.....	43
Figura 2.4. Dendrograma do relacionamento genético entre os biótipos B, C e E de <i>Schizaphis graminum</i> obtido com o método de agrupamento por UPGMA.....	44
Figura 3.1. Sistema de multiplicação das linhagens clonais de <i>Schizaphis graminum</i> coletadas para o estudo de diversidade genética temporal.....	60
Figura 3.2. Perfis RAPD de linhagens clonais de <i>Schizaphis graminum</i> coletadas no mês de maio de 2003, obtidos com o iniciador OPA-2.....	63
Figura 3.3. Perfis RAPD de linhagens clonais de <i>Schizaphis graminum</i> coletadas no mês de junho de 2003, obtidos com o iniciador OPC-2.....	63
Figura 3.4. Perfis dos genótipos de <i>Schizaphis graminum</i> obtidos com os iniciadores OPA-2 e OPC-2.....	64
Figura 3.5. Reação de suscetibilidade da cultivar EMBRAPA-16 a uma linhagem clonal de <i>Schizaphis graminum</i> coletada no mês de agosto.....	67

Figura 4.1. Perfis RAPD de <i>Metopolophium dirhodum</i> obtidos com iniciador OPA-7	87
Figura 4.2. Perfis RAPD de <i>Metopolophium dirhodum</i> obtidos com o iniciador OPA-3	87
Figura 4.3. Perfis RAPD de <i>Metopolophium dirhodum</i> obtidos com o iniciador OPA-7	88
Figura 4.4. Perfis RAPD de <i>Metopolophium dirhodum</i> obtidos com o iniciador OPA-2	88
Figura 4.5. Dendrograma das relações genéticas entre as linhagens clonais de <i>Metopolophium dirhodum</i>	89
Figura 4.6. Associação entre dissimilaridade genética e distância geográfica das Linhagens clonais de <i>Metopolophium dirhodum</i> coletadas em trigo.....	91
Figura 4.7. Associação entre dissimilaridade genética e distância geográfica das Linhagens clonais de <i>Metopolophium dirhodum</i> coletadas em aveia.....	92
Figura 5.1. Esquema do cistron do DNA ribossomal mais comumente encontrado em eucariotos.....	104
Figura 5.2. Alinhamento múltiplo das seqüências parciais do ITS2 de <i>M. dirhodum</i> Com a região homóloga de <i>A. pisum</i>	117
Figura 5.3. Árvore enraizada obtida pelo método “Neighbor Joining” mostrando a relação filogenética entre as linhagens clonais de <i>Metopolophium dirhodum</i> inferida pela saeqüência parcial do ITS2.....	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Locais de coleta dos biótipos de <i>Schizaphis graminum</i> do Brasil e Estados Unidos.....	34
Tabela 2.2. Espécies e variedades de plantas utilizadas na caracterização de biótipos de <i>Schizaphis graminum</i>	35
Tabela 2.3. AMOVA de linhagens clonais agrupadas por locais de coleta dentro de Estados e Biótipos.....	46
Tabela 3.1. Distribuição do número de genótipos de <i>Schizaphis graminum</i> entre as Amostras mensais no período de maio-agosto.Londrina. PR.....	57
Tabela 3.2. Definição dos genótipos de <i>Schizaphis grmainum</i> pelo polimorfismo gerados pelos iniciadores OPA-2 e OPC-2	64
Tabela 3.3. Diversidade de genótipos obtidos por RAPD nas amostras mensais de <i>Schizaphis graminum</i> coletadas no período de maio agosto de 2003 em uma lavoura de aveia-preta (<i>Avena strigosa</i>) IAPAR-61 . Londrina. PR.....	67
Tabela 4.1. Hospedeiros, locais, número de clones e códigos das linhagens clonais de <i>Metopolophium dirhodum</i>	83
Tabela 4.2. Níveis de polimorfismos encontrados com iniciadores de RAPD em 23 linhagens clonais de <i>Metopolophium dirhodum</i>	86
Tabela 5.1. Linhagens clonais, número e códigos das seqüências analisadas por linhagem, locais de coleta e plantas hospedeiras.....	110

Tabela 5.2. Composição de nucleotídeos (em % de A, T,C, G) e tamanho (pares de bases) das seqüências de ITS2 de <i>Metopolophium dirhodum</i>	116
Tabela 5.3. Diversidade de nucleotídeos (em %) das seqüências parciais de ITS2 em linhagens clonais de <i>Metopolophium dirhodum</i>	119
Tabela 5.4. Média das distâncias entre as seqüências dentro de mesma linhagem clonal estimada pelo modelo de dois parâmetros de Kimura.....	124
Tabela 5.5. Distâncias médias pareada entre as linhagens clonais obtidas pelo modelo de dois parâmetros de Kimura.....	125

PREFÁCIO

Na pesquisa entomológica aplicada à agricultura, o estudo da evolução dos biótipos ou raças de afídeos é de fundamental importância. Compreender como surgem e como são mantidas as variações na capacidade de colonizar e danificar os cultivos agrícolas permite estabelecer estratégias de controle mais sustentáveis.

O capítulo 1 da presente tese é uma tentativa de organização conceitual, em que certas terminologias usadas na Entomologia Agrícola são comparadas com conceitos da Taxonomia, Biologia Evolutiva e Genética de Populações. O termo biótipo é apresentado na sua forma mais abrangente, que inclui os vários níveis de diferenciação genética entre populações. No capítulo 2 é feita a caracterização dos biótipos do afídeo *Schizaphis graminum* (Rondani) por meio de marcadores RAPD, com o objetivo de se obter um novo método para identificação. O relacionamento de similaridades genéticas entre linhas clonais de mesmo ou de biótipo diferente permitiu indicações sobre a divergência genética entre categorias que aparentam uma definição muito arbitrária. O capítulo 3 teve como objetivo a observação da existência de variação genética detectável por RAPD em clones de *S. graminum* coletados em um mesmo local. A hipótese testada é se a variação genética encontrada mudaria ao longo do tempo. O capítulo 4 trata da variação genética por meio de RAPD no afídeo *Metopolophium dirhodum* (Walker). Nesse capítulo, são estudados os dois fatores poderiam ser responsáveis pela variação encontrada: distância geográfica ou espécie da planta hospedeira. Através de análises estatísticas especiais, foi apurada a contribuição de cada um dos fatores para a variação genética. Como segmento ao capítulo 4, o capítulo 5 tratou de uma investigação mais profunda sobre o significado da diferenciação genética encontrada em *M. dirhodum*. A forte associação encontrada entre um marcador RAPD e o

hospedeiro de origem de coleta tornou necessário um estudo para quantificar a divergência evolutiva entre essas populações capturadas sobre *Avena* e *Triticum*, que poderia tratar-se de um caso de especiação críptica. Por meio de sequenciamento de parte do DNA ribossomal, essa questão foi esclarecida.

No contexto geral deste trabalho, a diversidade genética das duas espécies de afídeos foi sempre relacionada com as alternativas de plantas hospedeiras que estes dispõe na natureza. Como se trata de duas espécies introduzidas, a variabilidade nas populações no novo local seria organizada pela seleção natural. Soma-se a isso, a ocorrência comum de mutações, principalmente cromossômicas, que podem gerar e, mesmo aumentar, as diferenças genéticas entre populações. O combate feito por meio de inseticidas e o controle biológico implementado com sucesso resultaram em uma intensa redução populacional dos afídeos. Sob essa redução, efeitos de deriva tornam-se comuns, o que conduz a uma diferenciação genética.

Embora os afídeos de cereais tenham uma distribuição mundial, certos fenômenos, principalmente a evolução de raças, pode ser um evento restrito a algumas regiões. Dessa forma, os afídeos de cereais no Brasil apresentam-se como uma excelente oportunidade de estudos nesse campo.

**Capítulo 1: Caracterização de Biótipos em Insetos, com
Referência Especial aos Afídeos**

Capítulo 1: Caracterização de Biótipos em Insetos, com Referência Especial aos Afídeos

Resumo

A caracterização de biótipos tem grande importância nas pesquisas aplicadas de Entomologia. Entretanto, a designação biótipo engloba vários níveis de diferenciação genética, que muitas vezes suscita dúvidas na taxonomia da espécie. As populações que possuem melhor adaptação a um determinado hospedeiro são designadas como “raças hospedeiro-especialistas” (*host-races*), sendo também incluídas no conceito de biótipo. A ocorrência dessas raças pode ser observada pelos seguintes critérios: as populações discriminadas devem coexistir em um mesmo local, possuindo um hospedeiro preferencial e apresentando diferenças no fluxo gênico em função do hospedeiro. A existência de raças hospedeiro-especialistas tem sido investigada em um grande número de insetos de importância agrícola, principalmente entre os afídeos. Este grupo de insetos tem servido como um organismo-modelo para estudos que utilizam técnicas de análise de DNA, em virtude da ocorrência de clones (indivíduos com o mesmo genoma). Esses estudos têm elucidado os efeitos do acúmulo de mutações, as vantagens da reprodução sexual sobre a assexual e os mecanismos de especiação simpátrica pela exploração diferencial de nichos. Em termos práticos, o melhor entendimento do surgimento das raças hospedeiro-especialistas pode se constituir em valioso instrumento para o manejo dos afídeos-praga via resistência da planta hospedeira.

Palavras-Chave: Raças hospedeiro-especialistas, coevolução planta-inseto, pulgões, resistência..

Chapter 1: Biotype Characterization in Insects with Special Reference to Aphids

Abstract

The characterization of biotypes has great importance in applied Entomology researches. However, the biotype designation covers several levels of genetic differences that many times leads doubts about species taxonomy. Populations that are better adapted to a particular host are called “host-races”, and they are included within the biotype concept. The occurrence of these races could be observed by the following criteria: discriminated populations must coexist in the same place, they have a preferential host and present differences in the gene flow due to the specific host. The existence of host-races has been investigated in a large number of agricultural pests, mainly in aphids. This insect group has been served as model-organisms in studies that use DNA analysis techniques, due to the occurrence of clones (individuals with same genome). These studies were aimed to elucidate the effects of mutations accumulation, advantages of sexual over asexual reproduction and sympatric speciation of organisms by differential exploration of niches. In practical terms, a better understanding of host-race evolution may be a valuable tool for aphid management based on host-plant resistance.

Key Words: Host-races, plant-insect coevolution, resistance

1.1 Conceito de biótipo

A caracterização de biótipos em insetos tem grande importância nas pesquisas aplicadas da Entomologia. A subjetividade de tal designação reflete, muitas vezes, problemas taxonômicos. Uma busca na literatura entomológica revela abundância de termos equivalentes a biótipo, tais como: raça biológica, raça ecológica, subespécie, espécie críptica, raça hospedeiro-especialista (*host-race*). De modo recente, o uso de técnicas moleculares para a análise do DNA permitiu uma melhor compreensão da variação intraespecífica em insetos. Assim, muitas das caracterizações de biótipos passaram a serem entendidas como parte do processo de especiação (Bellows *et al.* 1993).

Diehl & Bush (1984) propõem que o termo biótipo deve ser considerado como denominação genérica englobando vários casos de diferenciação entre populações. Os autores consideram a existência de cinco categorias de biótipo: 1. polifenismos não genéticos, 2. variação polimórfica ou poligênica intrapopulacional, 3. raças geográficas, 4. raças hospedeiro-especialistas e, 5. espécies. A última categoria é incluída como biótipo nas situações em que os taxonomistas ainda não reconhecem a categoria de nova espécie da forma variante. Os demais casos se referem apenas a variações intraespecíficas.

Os polifenismos ocorrem quando um mesmo genótipo produz diferentes fenótipos sob efeito de alguma condição ambiental. Padrões de coloração exibidos conforme época do ano e a presença ou a ausência de asas (como no caso dos afídeos) são exemplos de polifenismos. Os polimorfismos consistem de fenótipos distintos em uma população livre para inter cruzar, sendo que a frequência do fenótipo mais raro seja tal que não possa ser mantida por mutação recorrente, excedendo uma frequência acima de 1% (Futuyma 1992). O polimorfismo diferencia-se do polifenismo pela descontinuidade fenotípica e por ser produto de alelos distintos. O caso de raças geográficas é referido por Mayr (1970) como

sinonímia de subespécie, que são formas variantes delimitadas geograficamente e que apresentam um certo nível de isolamento reprodutivo.

A categoria de biótipo que necessita de uma cuidadosa definição e observação mais detalhada de sua ocorrência é a da raça hospedeiro-especialista pelo seu papel central na evolução e especiação de organismos parasíticos (Diehl & Bush 1984) e pela importância que têm na atividade agrícola (Saxena & Barrion 1987).

1.2 Conceito de raça hospedeiro-especialista

A primeira definição especialmente direcionada à raça hospedeiro-especialista foi proposta por Bush (1969), que a definiu como populações que demonstram preferência por um hospedeiro que é diferente dos hospedeiros preferenciais de outras populações da mesma espécie. Raças hospedeiro-especialistas representam uma variação contínua entre formas que cruzam livremente para aquelas que raramente trocam genes. O conceito mais amplamente citado para raça hospedeiro-especialista é o de Diehl & Bush (1984), que a define como uma população parcialmente isolada de outras populações de mesma espécie em consequência da adaptação ao hospedeiro.

O surgimento de raças hospedeiro-especialistas é explicado por Futuyma & Peterson (1985) pela diferenciação genética das populações em consequência da combinação da seleção natural, fluxo gênico e deriva genética. Em diferentes microambientes, recursos alimentares ou nichos, a seleção natural favorece um ou mais alelos, aumentando suas frequências, o que promove a melhor adaptação ao recurso. A principal causa da manutenção das diferenças genéticas é o balanço do fluxo gênico entre populações simpátricas (ocorrentes em uma mesma área). Nas populações que usam

recursos alimentares diferentes há um menor fluxo gênico que entre populações que usam o mesmo recurso alimentar.

Portanto, raça hospedeiro-especialista é considerada como uma divisão infraespecífica na Biologia Evolutiva, mas não reconhecida como uma categoria de classificação pela Taxonomia.

1.3 Critérios para detecção de raças hospedeiro-especialista

Jaenike (1981) propôs que a definição de raça hospedeiro-especialista deveria satisfazer uma série de critérios experimentais e observáveis: 1. populações devem ser simpátricas; 2. existência de significativa diferenciação genética, sugerindo que o fluxo gênico entre as populações raciais seja baixo; 3. os acasalamentos devem ocorrer próximo ou no hospedeiro preferencial, sendo que a escolha do hospedeiro deve ter base genética; 4. as diferenças não devem ser originadas somente pela seleção causada pelo hospedeiro sobre uma única geração de indivíduos e 5. em confinamento conjunto, as diferenças entre as populações devem desaparecer. Se as diferenças persistirem em um certo número de gerações, as populações devem ser consideradas como diferentes espécies e não raças, nas quais as diferenças são atribuídas exclusivamente à preferência por um hospedeiro no ambiente natural.

Bush (1992) incorporou muito dos critérios de Jaenike (1981) no seu estudo sobre a formação de raças hospedeiro-especialista e especiação simpátrica em moscas-das-frutas do gênero *Rhagoletis* (Diptera:Tephritidae). Adicionalmente, este autor cita o critério da compatibilidade reprodutiva do híbrido inter-racial com o restante da população.

Para Drés & Mallet (2002) há quatro critérios simples de detecção de raças hospedeiro-especialistas: 1. fidelidade ao hospedeiro; 2. simpatia; 3. diferenciação genética, 4. existência de fluxo gênico entre as populações.

O surgimento de raças hospedeiro-especialistas coaduna com a hipótese da especiação simpátrica (Berlocher & Feder 2002), ou seja, a teoria que estabelece que novas espécies podem surgir sem a necessidade de uma barreira física entre indivíduos de uma população.

Um estudo de casos, nos quais há uma razoável experimentação que leva em conta os critérios de estabelecimento de raças hospedeiro-especialistas (Jaenike 1981, Bush 1992), possibilitou a Drés & Mallet (2002) a definição de quatro situações de variação: 1. Polimorfismo, 2. Raça hospedeiro-especialista provável, 3. Raça hospedeiro-especialista típica, 4. Espécie críptica. Na primeira situação, estão os casos em que a divergência genética entre as populações que ocupam diferentes hospedeiros é insignificante ou inexistente. Testes de preferência e de parâmetros biológicos para a avaliação da adaptação ao hospedeiro não indicam diferenças entre as populações. Na situação de prováveis raças hospedeiro-especialistas, os casos têm em comum a associação de algumas frequências de alelos com o hospedeiro. No entanto, faltam informações consistentes sobre hibridação inter-racial e sobre os valores de fluxo gênico na natureza. Nos casos de raças hospedeiro-especialistas típicas, os critérios testados devem afastar a possibilidade do polimorfismo instável ou a existência de espécie críptica. (Jaenike 1981, Bush 1992).

No caso de ocorrência de mecanismos de isolamentos pré-copulatórios (incompatibilidade de cópula entre indivíduos de populações de diferentes hospedeiros) ou pós-copulatórios (inviabilidade do híbrido inter-racial), Drés & Mallet (2002) o definem como um caso de espécies crípticas associadas ao hospedeiro.

1.4 Ocorrência e importância de biótipos de insetos na agricultura

A categoria mais comum de biótipos na agricultura é a das variações polimórficas oriundas da seleção imposta por inseticidas ou por diferentes genótipos de plantas cultivadas (Diehl & Bush 1984). Como exemplo, *Mayetola destructor* (Say) (Diptera, Cecidomiidae), a “mosca-hessiana”, apresenta dez biótipos definidos por diferenças na capacidade de danificar (virulência) e sobreviver em diferentes cultivares de trigo. A virulência é controlada por genes recessivos não alélicos que interagem com 13 genes de resistência em trigo (Diehl & Bush 1984). Dessa forma, a designação de biótipos se mostra muito arbitrária, pois as interações de genes de virulência com genes de resistência teriam como resultado 8.192 combinações (2^{13}), que seria o número possível de biótipos. No entanto, apenas quatro genes têm sido utilizados para a identificação dos biótipos dentro de programas de melhoramento de trigo visando resistência à praga. Isto resulta na distinção de 16 biótipos (Gallun, 1977 *apud* Diehl & Bus 1984).

Há casos em que a ocorrência de biótipos de pragas agrícolas não é consequência da seleção causada pelos métodos de controle. São típicos problemas de indefinição taxonômica. Como exemplo, a cigarrinha *Nilaparvata lugens* (Stal) (Hemiptera: Delphacidae), praga do arroz na Ásia, foi relatada na revisão de Diehl & Bush (1984) como um caso de variação polimórfica. Entretanto, para Drés & Mallet (2002), a variação polimórfica nesta espécie existe apenas entre os biótipos ocorrentes em arroz. Demonstrou-se que as populações de *N. lugens* de gramíneas selvagens constituem uma outra espécie (críptica), pois não se cruzam com aquelas de arroz (Claridge *et al.* 1985). Isolamento reprodutivo também foi encontrado entre populações de *Spodoptera frugiperda* J.E.Smith de milho e arroz (Pashley *et al.* 1992). Na mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius), o biótipo B foi elevado à categoria de espécie, denominada *Bemisia argentifolii* Bellows &

Perring, 1994 (Bellows *et al.* 1994). Martinez *et al.* (2000) demonstraram que as populações de *B. tabaci* que colonizam mandioca são distintas geneticamente das populações dos biótipos A e B em simpatria, o que levou os autores a postularem a existência de um biótipo ainda não-descrito. Abdullahi *et al.* (2003) afirmam que, na África, as populações de *B. tabaci* em mandioca também são geneticamente muito distintas das populações oriundas de outros hospedeiros.

A relação entre planta hospedeira e distribuição espacial de biótipos também tem sido alvo de estudos. Em *Ostrinia nubilalis* Huebner (Lepidoptera: Pyralidae) a broca-européia-do-milho, foram descritas formas variantes associadas à distribuição geográfica. Estas formas apresentam diferenças morfométricas e ecológicas que, aparentemente, seriam classificadas como polifenismo (Diehl & Bush 1984). Entretanto, Bourguet *et al.* (2003), empregando marcadores moleculares baseados em seqüências microssatélites de DNA, encontraram um baixo fluxo gênico entre populações de milho com populações de outros hospedeiros selvagens, em um mesmo local. Esse fato é contrastante com o alto fluxo gênico encontrado entre populações de diferentes localidades que utilizam o milho como hospedeiro, sugerindo uma diferenciação causada pela planta. Em outros casos, a variação na utilização do hospedeiro pode ser consequência de uma grande distribuição geográfica, como a que ocorre com o besouro-colorado-da-batata, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae). Esse inseto utiliza mais freqüentemente uma determinada espécie de planta em uma região em razão de sua maior abundância e não pela adaptação preferencial (Diehl & Bush 1984).

O conhecimento da existência de biótipos em insetos de importância agrícola é fundamental para o manejo integrado de pragas. Para evitar que haja altas infestações de pragas em lavouras, recomenda-se destruir hospedeiros alternativos (Gallo *et al.* 2002). Em

alguns casos, tal prática pode ser dispensada, pois é possível que a população que está infestando uma espécie de planta, não possa infestar à outra.

Também, a ocorrência da interação gene-a-gene (gene de virulência do parasita-gene de resistência do hospedeiro) constitui uma informação básica para o melhoramento de plantas visando resistência às pragas.

1.5 Ciclo de vida e ocorrência de biótipos em Aphididae

Considera-se que certas características particulares do ciclo de vida dos afídeos contribuem para a evolução de biótipos nesse grupo de insetos (Futuyma & Peterson 1985, Saxena & Barrion 1987). O ciclo de vida dos afídeos (pulgões) pode incluir gerações sexuais e partenogênicas, com alternância obrigatória entre plantas hospedeiras de táxons não relacionados. Fatores ambientais, como o fotoperíodo e a temperatura, exercem grande influência sobre o ciclo vital de espécies que tenham uma ampla distribuição geográfica. O ciclo de vida mais comum em regiões temperadas é o holociclo, onde ocorre a produção de machos e de fêmeas ovíparas em determinadas épocas do ano e, em outras, somente fêmeas vivíparas partenogênicas. A alternância de hospedeiros é uma característica especialmente marcante dos afídeos, dentre os insetos. Quando existe alternância de desenvolvimento do afídeo entre um hospedeiro lenhoso e um herbáceo, o holociclo é denominado heteroécio. Quando a alternância ocorre em um mesmo tipo de hospedeiro, o holociclo denomina-se monoécio (Dixon 1985). Uma das hipóteses que explica o surgimento da alternância hospedeira é a Hipótese da Complementaridade (Moran 1992), que estabelece que a alternância surgiu nas épocas de maior evolução radial de gimnospermas (Jurássico e Cretáceo) e das angiospermas (Cretáceo e Terciário) (Moran 1992, Von Dohlen & Moran 2000). Respostas fisiológicas adaptativas de plantas às mudanças climáticas tornaram

muitas espécies lenhosas, em certas épocas, inapropriadas para a nutrição dos afídeos. A seleção natural favoreceu, então, a alternância hospedeira, pois as migrações para outras plantas, principalmente herbáceas, proporcionaram um complemento de recursos alimentares. A geração de indivíduos com maior diversidade genética através de recombinação sexual possibilita melhor adaptação a plantas quimicamente muito diferentes. A colonização de plantas hospedeiras herbáceas, que têm um ciclo de vida curto, seria muito mais eficiente se a reprodução fosse rápida. Isto, provavelmente favoreceu a retenção da partenogênese no hospedeiro secundário (Moran 1992).

O aparecimento do holociclo monoécio é um evento posterior ao holociclo heteroécio (Dixon 1985, Moran 1992). Nas regiões subtropicais ou tropicais, o ciclo de vida predominante é o anolociclo, onde a reprodução é somente por partenogênese do tipo telítoca. Fêmeas não fecundadas dão origem a outras fêmeas, geneticamente iguais às suas mães, conhecidas como clones (Dixon 1985). O principal fator ambiental que induz o ciclo sexual ou a ausência dele é o fotoperíodo. Populações de espécies de afídeos encontrados em latitudes mais baixas são majoritariamente anolocíclicas em comparação com as populações encontradas em latitudes mais altas (Dixon 1985).

Entretanto, dentre as particularidades do ciclo de vida dos afídeos, a ocorrência da partenogênese é considerada como o principal fator responsável pela evolução de biótipos em afídeos. Havendo barreiras ao fluxo gênico entre os indivíduos, o efeito da seleção pela planta hospedeira rapidamente conduz à especialização das populações (Futuyma & Peterson 1985) e portanto, à ocorrência de biótipos.

Para conceituar biótipo em afídeos, Muller (1981) usa a definição dada por Von Keler em 1963, que afirma que são indivíduos com igual genótipo. Esse conceito é desconsiderado por Eastop (1973), que afirma que o termo “clone” é mais apropriado para

designar tal situação. Para este autor, biótipos são reconhecidos mais por uma função biológica do que por um carácter morfológico. Eastop (1973) também argumenta que biótipo não poderia constituir-se uma categoria exclusiva. Parte da progênie de uma fêmea não-partenogenética pode pertencer a um biótipo e parte a outro, de acordo com a característica que seja utilizada para definição biotípica. Um termo recentemente proposto por Wilson *et al.* (2003) é “linha isofêmea” (*isofemale line*), que indicaria a descendência de uma determinada fêmea partenogenética.

Atualmente, o termo biótipo é empregado nos estudos de afídeos para discriminar a variação na adaptação ao hospedeiro (Eastop 1973, Wilhoit & Mitler 1991, Anstead *et al.* 2002). Designações especiais para populações resistentes a inseticidas têm sido eliminadas ou desconsideradas na literatura (Puterka & Peters 1990).

Existem casos de certo grau de indefinição taxonômica em afídeos que transcendem a discussão relativa a biótipo. São os chamados “complexos de espécies”, relatados, por exemplo, para as espécies *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas), *Myzus persicae* (Sulzer), *Aphis fabae* Scopoli, *Aphis frangulae* Kaltenbach (incluído como grupo de *Aphis gossypii*) (Muller 1981). Há, nesses complexos, variações na morfologia e nos padrões de colonização de hospedeiros. Em *M. persicae*, as populações que utilizam o tabaco (*Nicotiana tabacum*) como planta hospedeira, apresentam características morfométricas muito diferentes de outras populações da espécie, o que levou Blackman (1987) a designar essas populações de tabaco como uma nova espécie: *Myzus nicotianae* Blackman.

Nos casos em que são descritas raças hospedeiro-especialistas, existem diferenças marcantes na preferência de planta hospedeira em situações de dualidade. Com exemplo, as populações de *Aphis citricola* Van der Goot em *Citrus unshiu* Marcovitch e *Spiraea thunbergii* Siebold exibem grandes diferenças na sobrevivência conforme o hospedeiro

(Komazki 1986 *apud* Drés & Mallet, 2002). As populações de *Cryptomyizus galeopsidis* (Kaltenbach) têm alta divergência na frequência de aloenzimas conforme o hospedeiro, mas formam híbridos quando criadas em conjunto (Gudelmond *et al.* 1994 *apud* Drés & Mallet). O caso mais estudado sobre a ocorrência de raça hospedeiro-especialista é o do pulgão-da-ervilha *Acyrtosiphon pisum* Harris, que possui populações adaptadas à alfafa (*Medicago sativa* L.) e populações adaptadas ao trevo-vermelho (*Trifolium pratense* L.) na América do Norte. Essas duas populações diferem na frequência de aloenzimas e na escolha de hospedeiro (Via 1999) e, também exibem preferência em laboratório pelo próprio hospedeiro de campo (Caillaud & Via 2000).

Em pulgões que colonizam gramíneas, a ocorrência de biótipos mais estudada é a que ocorre em *Schizaphis graminum* Rondani. (Anstead *et al.* 2002). Também, há relatos da existência de biótipos em *Sitobion avenae* (F.). (Lushai *et al.* 2002). Outros pulgões de importância econômica, principalmente como pragas do trigo, exibem variabilidade genética que ainda não foi associada à hipótese de ocorrência de raças hospedeiro-especialista, como em *Rhopalosiphum padi* (L.) e *Metopolophium dirhodum* Walker (Martinez-Torres *et al.* 1997, Nicol *et al.* 1997).

1.6 Estudos moleculares para caracterização de biótipos de afídeos

As técnicas de análise de DNA têm tido grande aplicação em estudos de genética populacional, ecologia, taxonomia e filogenia de insetos (Loxdale & Lushai 1998). Em biótipos de insetos, nos quais suspeita-se da existência de espécies crípticas, o uso de marcadores moleculares e sequenciamento de regiões do genoma têm sido muito úteis (Favia *et al.* 1994, Beebe & Saul 1995). Fragmentos de DNA obtidos por RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) são os marcadores mais utilizados e contribuem para a

diagnose de biótipos, principalmente raças hospedeiro-especialistas (Caterino *et al.* 2000). Esses marcadores são também utilizados para detecção de variabilidade genética intrapopulacional de agentes de controle biológico (Edwards & Hoy 1993) ou para determinar a provável origem geográfica de pragas (Williams *et al.* 1994). Em afídeos de importância agrícola, o RAPD tem diferenciado biótipos e revelado também variabilidade genética dentro de biótipos (Black *et al.* 1992). Em *A. pisum*, clones que apresentavam “alta virulência” para alfafa foram distinguidos por RAPD de clones de ‘baixa virulência’ (Bournoville *et al.* 2000). Com o uso desses marcadores, alguns perfis de fragmento de DNA amplificados de clones de *S. avenae* foram associados a um determinado hospedeiro (Lushai *et al.* 2002). Independentemente da localidade, marcadores RAPD distinguiram quase que perfeitamente populações de *Therioaphis trifolii* infestando alfafa das que infestavam trevo subterrâneo (*Trifolium subterraneum*) (Sunnucks *et al.* 1997). Entretanto, *M. persicae* e *M. nicotianae* (= *Myzus persicae* biótipo de tabaco), não foram distinguidos por RAPD, embora um marcador fortemente relacionado com o segundo biótipo tenha sido encontrado (Margaritopoulos *et al.* 1997).

Para estudo da estrutura genética e de ocorrência geográfica do ciclo sexual, marcadores microssatélites são mais recomendados por serem codominantes (Simon *et al.* 1999). Em estudos filogenéticos, o seqüenciamento do DNA mitocondrial tem elucidado questões sobre os níveis de divergência evolutiva em biótipos de afídeos (Anstead *et al.* 2002).

Os afídeos têm sido estudados sob variados enfoques, empregando-se as técnicas de análise de DNA. Isso decorre da pequena quantidade de polimorfismos que podem ser obtidos com a utilização de marcadores morfológicos ou com a análise de enzimas. (Loxdale 1990). Pelas suas características biológicas únicas, os afídeos servem como

organismos-modelo para estudo de vantagens da reprodução sexual sobre a assexual, os efeitos do acúmulo de mutações e a evolução simpátrica pela exploração diferencial de nichos (Moran 1992, Via 1999). Em pesquisas mais aplicadas, o melhor entendimento do surgimento das raças hospedeiro-especialistas pode ter grande utilidade para o manejo dos afídeos-pragas via incorporação de genes resistência de plantas, dentro dos programas de melhoramento de cultivos agrícolas.

Literatura Citada

Abdullahi, G.; I. Atiri; G. Thottappilly & S. Winter. 2004. Discrimination of cassava associated *Bemisia tabaci* in Africa from polyphagous populations, by PCR-RFLP of the internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA. *Journal of Applied Entomology* 128: 81-85.

Anstead, J.A.; J.D Burd & K. A. Shufran. 2002. Mitochondrial DNA sequence divergence among *Schizaphis graminum* isolates from non-cultivated hosts: haplotypes and host associations. *Bulletin of Entomological Research* 92:17-24.

Beebe, N.W & A. Saul. 1995. Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene* 53:478-481.

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

Berlocher, S.H. & J.L. Feder. 2002. Sympatric speciation in phytophagous insects: moving beyond controversy? *Annual Review of Entomology* 47:773-815.

Black IV, W.C.; N.M. DuTeau; G.J. Puterka; J.R. Nechols & J.M. Pettorini. 1992. Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* 82: 151-159.

Blackman, R.L. 1987. Morphological discrimination of a tobacco-feeding form from *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera:Aphididae), and a key to New World *Myzus* (*Nectarosiphon*) species. *Bulletin of Entomological Research* 77: 713-730.

Bournoville, R.; J.C. Simon; I. Badenhauser; C. Girousse; T. Guilloux & S.André. 2000. Clones of pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera:Aphididae) distinguished using genetic markers, differ in their damaging effect on resistant alfalfa cultivar. *Bulletin of Entomological Research* 90: 33-39.

Bourget, D.; M.T. Bethenod; N. Pasteur & F. Viard. 2000. Gene flow in the European corn borer *Ostrinia nubilalis*: implications for the sustainability of transgenic insecticidal maize. *Proceeding of the Royal Society of London B* 267: 117–122.

Bush, G.L. 1969. Sympatric host race formation and speciation in frugivorous flies of the genus *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae). *Evolution* 23:237-251.

Bush, G.L. 1992. Host race formation and sympatric speciation in *Rhagoletis* fruitflies (Diptera: Tephritidae). *Psyche* 99: 335-358.

Caillaud, C.M. & S. Via. 2000. Specialized feeding behavior influences both ecological specialization and assortative mating in sympatric host races of pea aphids. *The American Naturalist* 156: 606-621.

Caterino, M.S.; C. Cho & F. A. H. Sperling. 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of Babel. *Annual Review Entomology* 45: 1-54.

Claridge, M. F.; J.D. Hollander & J.C. Morgan. 1985. The status of weed associated populations of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal). Host-race or biological species? *Zoological Journal of Linnean Society* 84: 77-90.

Diehl, S.R. & G.L. Bush. 1984. An evolutionary and applied perspective of insect biotypes. *Annual Review of Entomology* 29: 471-504.

Dixon, A.F.G. 1985. Structure of aphid populations. *Annual Review of Entomology* 30:155-174.

Dres, M & J. Mallet. 2002. Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. *Philosophical Transactions of Royal Society of London* 357: 471-492.

Eastop, V. F. 1973. Biotype of aphids. In: Lowe, A. D. (ed.). Perspectives in aphid biology. Auckland, New Zealand, The Entomological Society of New Zealand.

Edwards, O.R. & M.A. Hoy. 1993. Polymorphisms in two parasitoids detected using random amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR. Biological Control 3: 243.

Favia, G.; G. Dimopoulos; A. Della Torre; Y. T. Touré & M. Coluzzi. 1994. Polymorphisms detected by random PCR distinguishes between different chromosomal forms of *Anopheles gambiae*. Proceedings of National Academy of Science 91:10315-10319.

Futuyma, D. J. & S. C. Peterson. 1985. Genetic variation in the use of resources by insects. Annual Review of Entomology 30:217-238.

Futuyma, D.J. 1992. Biologia evolutiva. Sociedade Brasileira de Genética. 2ed.

Gallo, D.; O. Nakano; S. Silveira Neto; R.P.L. Carvalho; G.C. Batista; E.B. Filho; J.R.P. Parra; R.A. Zucchi; S.B. Alves; J.D. Vendramim; L.C. Marchini; J.R.S. Lopes & C. Omoto. 2002. Manual de Entomologia Agrícola. FEALQ. Piracicaba. 920p.

Jaenike, J. 1981. Criteria for ascertaining the existence of host races. American Naturalist 117: 830-834.

Loxdale, H.D. 1990. Estimating levels of gene flow between natural-populations of cereal aphids (Homoptera, Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* 80: 331-338.

Loxdale, H.D. & G. Lushai. 1998. Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research* 88: 577 – 600.

Lushai G.; O. Markovitch & H.D. Loxdale. 2002. Host-based genotype variation in insects revisited. *Bulletin of Entomological Research* 92: 159-64.

Margaritopoulos J.T.; J.A. Tsitsipis, E. Zintzaras, R. L. Blackman 2000. Host-correlated morphological variation of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) populations in Greece. *Bulletin of Entomological Research* 90: 233-244.

Martinez, S.S.; A.O.R. Carvalho; L.G.E. Vieira; L.M. Nunes & A. Bianchini. 2000. Identification, geographical distribution and host plants of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotypes (Homoptera: Aleyrodidae) in the State of Parana, Brazil. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 29: 597-603.

Martinez-Torres, D.; A. Moya ; P.D.N. Herbert & J.C. Simon. 1997. Geographic distribution and seasonal variation of mitochondrial DNA haplotypes in the aphid *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera : Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* 87: 161-167.

Mayr, E. 1970. Populations, species and evolution: an abridgement of animal species and Evolution. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Moran, N. 1992. The evolution of life cycles in aphids. Annual Review of Entomology 37: 321-348.

Müller, F.P. 1981. Biotype formation and sympatric speciation in aphids. Proceedings of International Aphid Symposium at Jablonna 135-166.

Nicol, D.; K. F. Armstrong; S. D. Wratten; C. M. Cameron; C. Frampton & B. Fenton. 1997. Genetic variation in an introduced aphid pest (*Metopolophium dirhodum*) in New Zealand and relation to individuals from Europe. Molecular Ecology 6: 255–265

Pashley, D.P.; A.M. Hammond & T.N. Hardy. 1992. Reproductive isolating mechanisms in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). Annals of Entomological Society of America 85: 400-405.

Saxena, R.C. & A.A. Barrion. 1987. Bioypes of insect pests of agricultural crops. Insect Science Applied 8: 454-458.

Simon, J. C.; S. Baumann; P. Sunnucks; P. D. Hebert; J. S. Pierre; J. F. Le Gallic; C. A. Dedryver. 1999. Reproductive mode and population genetic structure of the cereal aphid *Sitobion avenae* studied using phenotypic and microsatellite markers. Molecular Ecology 8: 531-545.

Sunnucks, P.; F. Driver; W.V. Brown; M. Carver; D.F.Hales & W.M. Milne.1997. Biological and genetic characterization of morphological similar *Therioaphis trifolii* (Hemiptera:Aphididae) with different host-utilization. Bulletin of Entomological Research 87:425-436.

Via, S. 1999. Reproductive isolation between sympatric races of pea aphids. I- Gene flow restriction and habitat choice. Evolution 53: 1446-1457.

Von Dohlen, C.D. & N. A. Moran. 2000. Molecular data support a rapid radiation of aphids in the Cretaceous and multiple origins of host alternation. Biological Journal of the Linnean Society 71: 689-717.

Wilhoit, L.R. & T.E. Mittler. 1991. Biotypes and clonal variation in greenbug (Homoptera: Aphididae) populations from a locality in California. Environmental Entomology 20: 757-767.

Williams, C. L.; S. L. Goldson; D.B.Baird & D.W.Bullock. 1994. Geographical origin of an introduced insect pest, *Listronotus bonariensis* (Kuschel) determined by RAPD analysis. Heredity 72: 412-419.

Wilson, A.C.C.; P. Sunnucks & D. F. Hales. 2003. Heritable genetic variation and potential for adaptive evolution in asexual aphids (Aphidoidea). Biological Journal of the Linnean Society 79: 115-135.

Capítulo 2: Caracterização e relacionamento genético entre biótipos de *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphididae) que ocorrem no Brasil usando marcadores RAPD

Capítulo 2: Caracterização e relacionamento genético entre biótipos de *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphididae) que ocorrem no Brasil usando marcadores RAPD

Resumo

O pulgão-verde-dos-cereais, *Schizaphis graminum* (Rondani), é uma das mais importantes pragas de cereais no mundo. Nas populações dessa espécie, podem ser distinguidos vários biótipos, que são clones que compartilham a mesma relação de virulência com plantas cultivadas. Visando diminuir custos, aumentar a rapidez na identificação de biótipos e caracterizar geneticamente populações de insetos, marcadores moleculares têm sido bastante utilizados. Com o propósito de encontrar marcadores RAPD para identificar biótipos de *S. graminum*, dezenove linhagens clonais do Brasil e três oriundas dos Estados Unidos (usadas como referência) dos três biótipos (B,C e E) foram examinadas. Dezoito iniciadores foram utilizados para a análise das linhagens clonais. Apenas seis iniciadores revelaram polimorfismos e, dentre estes, apenas três foram diagnósticos para discriminar os três biótipos. Utilizando o Índice de Similaridade de Jaccard e agrupamento por UPGMA, foi demonstrado que o biótipo B é geneticamente distinto de C e E, e estes são muito relacionados entre si. O biótipo C foi o que apresentou maior diversidade, enquanto que o biótipo E foi o menos diverso. Análise da Variância Molecular (AMOVA) mostrou que linhagens clonais pertencentes à mesma categoria biotípica têm menor variância genética do que linhagens clonais agrupadas conforme a similaridade geográfica.

Palavras-chave: Variabilidade genética, marcador molecular, pulgão-verde-dos-cereais, relação inseto-planta

Chapter 2: Characterization and genetic relationships among Brazilian biotypes of *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphididae) using RAPD markers

Abstract

The greenbug *Schizaphis graminum* (Rondani) is one of the most important cereals pests in the world. Within populations of this species, several biotypes, which are clones that share the same virulence relationships with cultivated plants, can be distinguished. Molecular markers have been used to genetically characterize insect populations because their rapidity and cost effectiveness. In order to find RAPD markers to identify Brazilian *S. graminum* biotypes, nineteen clonal populations of three biotypes (B, C and E) from Brazil and three clonal populations from the U.S (used as reference) were examined. Eighteen primers were used to analyze the material, but only six primers revealed polymorphisms and among those, three produced diagnostic band profiles that allowed biotype characterization. Using Jaccard Similarity Index and UPGMA clustering method it was possible to show that biotype B is genetically very distinct from C and E, which are closely related to each other. The biotype C showed the largest genetic diversity, while biotype E was the least diverse. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) showed that genetic variance among clonal populations belonging to the same biotype is smaller than among clonal populations grouped according to the geographical similarity.

Key words: Genetic variability, molecular marker, greenbug, insect-plant relationship

2.1 Introdução

2.1.1 Ciclo de Vida de *S. graminum*

Na América do Norte, *Schizaphis graminum* (Rondani 1852) . apresenta os dois tipos de ciclo de vida. Ao sul dos Estados Unidos, o ciclo é do tipo anolociclíco e nas

latitudes setentrionais torna-se holocíclico. A ocorrência da reprodução sexual tem uma íntima associação com o “bluegrass” (*Poa pratensis*), pois machos e fêmeas são encontrados juntos apenas nesta planta (Puterka & Peters 1990). A produção de formas sexuais de *S. graminum* em condições de laboratório é facilmente induzida. O método utilizado por Puterka & Slosser (1983) consiste na transferência de um clone de uma condição de criação em 12 horas de fotofase para uma condição com 11 horas, sob uma temperatura abaixo de 22°C. Essa metodologia pode induzir a produção de formas sexuais em todos os biótipos de *S. graminum*, com exceção dos biótipos B e H, que parecem ser exclusivamente anolocíclicos. Apesar da facilidade da produção de machos e de fêmeas, a incubação dos ovos de *S. graminum* apresenta resultados insatisfatórios em condições de laboratório. As melhores taxas obtidas para a eclosão de ninfas variam entre 19 a 26 % (Puterka & Peters 1990).

Cruzamentos entre biótipos são eventos considerados raros tanto na natureza como em condições de laboratório, pois a atração sexual é maior dentro do mesmo biótipo (Eisenbach & Mittler 1980).

Cabette (1995) relata a ocorrência de formas gâmicas e ambifásicas em laboratório e no campo, no Estado de São Paulo. Entretanto, não há relato de que o holociclo ocorra em *S. graminum* nas condições tropicais e subtropicais do Brasil.

2.1.2 Histórico da caracterização dos biótipos de *S. graminum*

Todas as descrições dos biótipos de *S. graminum* foram realizadas nos Estados Unidos. Atualmente, é consenso de que biótipos em *S. graminum* correspondem a grupos de clones com mesma relação de “virulência” (dano) a uma série de genótipos de plantas

diferenciadoras (Porter *et al.* 1997). A identificação dos biótipos pode ser feita pela Técnica de Escala de Danos ou pela Técnica de Qualificação da Lesão (Puterka & Peters 1988). Os biótipos de *S. graminum* são identificados de modo simples, num sistema binário: “virulento-avirulento” a uma coleção de plantas usadas como diferenciadoras. Parâmetros biológicos, tais como sobrevivência e fecundidade, que também são utilizados para caracterizar biótipos, são de maior dificuldade para a avaliação, pois são caracteres quantitativos que sofrem acentuada influência do meio ambiente.

A primeira cultivar de trigo desenvolvida como resistente a *S. graminum* foi a DS28A (Painter & Peters 1956). Esta cultivar foi obtida por meio de testes de genótipos de trigo com uma população de *S. graminum* mantida em casa-de-vegetação, em Oklahoma. Após três anos de plantio de DS28A, verificou-se, a campo, a existência de populações capazes de danificar esta cultivar (Wood 1961 *apud* Puterka & Peters 1990). As populações “virulentas” de *S. graminum* foram designadas como biótipo B em oposição à população “avirulenta” à DS28A, designada como biótipo A.

Em 1968, ocorreu um ataque maciço de *S. graminum* em plantações de sorgo em Oklahoma e Kansas, EUA. Até então, não havia registros de danos deste afídeo ao sorgo. As populações “virulentas” ao sorgo foram denominadas de biótipo C (Harvey & Hackerott 1969). O biótipo C também é “virulento” à cultivar de trigo DS28A, diferenciando-se do B pela sua virulência ao sorgo. A fonte de resistência a este biótipo foi encontrada na cultivar de trigo chamada de Amigo. Porter *et al.* (1982) encontraram populações capazes de danificar essa cultivar e designaram um novo biótipo, o biótipo E. Este biótipo é incapaz de danificar a cultivar de trigo Largo. Durante levantamentos para caracterizações de biótipos nas áreas produtoras de trigo, Kindler & Spomer (1986) encontraram um novo biótipo,

“virulento” às cultivares Amigo e Largo e “avirulento” à DS28A, que foi denominado como biótipo F.

Novos levantamentos realizados em Oklahoma (Kerns *et al.* 1987) e no Texas (Bush *et al.* 1987) detectaram dois novos biótipos, designados como G e H por Puterka *et al.* (1988). O biótipo G é “virulento” a todas as fontes de resistência em trigo, mas é “avirulento” ao sorgo e à cevada. O biótipo H compartilha todas as relações de “virulência” com o biótipo E em trigo, mas é “avirulento” ao sorgo. É o único biótipo capaz de danificar a cultivar Post de cevada. Harvey *et al.* (1991) relataram a existência de clones de *S. graminum* capazes de danificar sorgo E-resistente, com exceção da linhagem de sorgo PI 266965, tendo reações similares a do biótipo E em trigo. Esses clones foram designados como biótipo I. Beregovoy & Peters (1995) descreveram um isolado de *S. graminum* proveniente de Idaho, EUA, que era “avirulento” a todas as fontes de resistência testadas. Este biótipo foi designado como biótipo J. Harvey *et al.* (1997) designaram como biótipo K, clones capazes de danificar a linhagem PI 550610, um germoplasma de sorgo I-resistente.

O único biótipo caracterizado de forma diferente daquela que usa as relações de “virulência” com genótipos de trigo e sorgo foi o biótipo D. Este foi designado pela sua resistência a inseticidas do grupo dos organofosforados (Teetes *et al.* 1975). Atualmente, essa designação foi abandonada por ser inválida para programas de melhoramento de trigo ou sorgo para resistência a *S. graminum* (Porter *et al.* 1997).

Baseado nos registros históricos, Porter *et al.* (1997) propuseram que não há relação entre o emprego de cultivares resistentes e desenvolvimento de novos biótipos. Assim, os biótipos de *S. graminum* seriam muito mais indivíduos pré-adaptados oportunistas, cuja a detecção do aparecimento no campo não mantém uma relação direta com o lançamento de

cultivares resistentes. Dentre todos os biótipos, apenas C e E são considerados mais importantes economicamente em virtude dos danos às culturas de trigo e sorgo (Puterka & Peters 1990).

2.1.3 Ocorrência de Biótipos de *S. graminum* no Brasil

Tonet (1999) fez um histórico das primeiras caracterizações de biótipos de *S. graminum* no Brasil. Em 1993, todos os 26 clones coletados pela EMBRAPA-Trigo nas regiões produtoras de trigo no Brasil pertenciam ao biótipo C. Em 1994, apenas os pulgões coletados na região de Santa Rosa-RS, pertenciam ao biótipo C. Presumiu-se que a incorporação da fonte de resistência ao biótipo C de *S. graminum* (proveniente da variedade Amigo) nas variedades BR-36 e EMBRAPA-16 possam ter feito uma seleção em favor do biótipo E (Tonet, informação pessoal). Em 1996 foram encontrados biótipos C e E nas maioria das áreas tritícolas do Brasil, sendo que os clones oriundos de Guaíra - PR, Fátima do Sul - MS e Caarapó - MS pertenciam ao biótipo B (Tonet, 1999).

S. graminum tem sido muito pouco estudado no Brasil em relação à caracterização de populações, a despeito dos danos economicamente importantes que causa às culturas de trigo e sorgo. Na literatura brasileira, destaca-se o trabalho de Rubin-de-Celis *et al.* (1997) em que três populações brasileiras, oriundas de Dourados-MS, Jaguariúna-SP e Passo Fundo-RS, foram caracterizadas através de perfis eletroforéticos de isoenzimas. Foi observada uma maior semelhança genética entre as populações de Dourados e Jaguariúna entre si do que estas com a população de Passo Fundo. Os padrões morfométricos também tiveram resultados em consonância com os padrões isoenzimáticos (Rubin-de-Celis *et al.* 1997). Estes estudos indicaram que a variação encontrada entre as populações foi devida ao isolamento geográfico. No entanto, como as populações não foram caracterizadas em

termos de biótipo, não foi possível estabelecer se a variação observada é correlacionada com o distanciamento geográfico destas populações ou com a própria diferença entre biótipos.

2.1.4 Genética da “Virulência” de *S. graminum*

Os genes de resistência de trigo a biótipos de *S. graminum* são conhecidos pela sigla Gb. Assim, a variedade DS28A carrega o gene Gb1 que confere resistência ao biótipo A, o gene Gb2 existente na variedade Amigo condiciona resistência ao biótipo C e o gene Gb3 da variedade Largo condiciona resistência ao biótipo E (Puterka & Peters 1990).

Puterka & Peters (1990) concluíram que os genes que condicionam a virulência são duplicados e estão localizados no mesmo cromossomo. Eisenbach & Mittler (1987) observaram que a habilidade de superar a resistência da variedade de sorgo IS809 (C-resistente, E-suscetível) é herdada maternamente. Os cruzamentos de machos de biótipo C com fêmeas do biótipo E produziram indivíduos que se comportaram como biótipo E. De modo contrário, cruzamentos de machos do biótipo E com fêmeas do biótipo C resultaram em indivíduos identificados como biótipo C.

2.1.5. Endosimbiontes e “Virulência”

A herança extra-nuclear, ou seja, aquela que é oriunda apenas da linhagem materna tem sido apontada como um fator que afeta a adaptação (*fitness*) de populações de espécies de insetos (Skinner 1985 *apud* Eisenbach & Mittler 1987). As bactérias do gênero *Buchnera* são simbiontes de afídeos transmitidos via transovariana, e responsáveis pela síntese de alguns aminoácidos utilizados pelos afídeos. Além disto, podem fornecer certas enzimas que são capazes de hidrolisar a matriz polissacarídea de plantas, fato documentado

para *S. graminum* (Eisenbach & Mittler 1987). Estas enzimas facilitam a penetração do estilete do afídeo nos espaços intercelulares, e o aumento da atividade dessas enzimas tem sido correlacionado com a virulência do biótipo E ao sorgo C-resistente (Campbell & Dreyer 1985, Campbell *et al.* 1986). Desta forma, suspeita-se que esta bactéria tenha uma relação direta com o grau de virulência de *S. graminum*.

2.1.6 Estudos Moleculares com RAPD em *S. graminum*

Os estudos com marcadores RAPD em *S. graminum* são restritos aos Estados Unidos e em particular em Universidades e Institutos de Pesquisas de Kansas, Nebraska e Oklahoma. Entretanto, nesses estudos foram utilizados poucos clones de cada biótipo. No trabalho de Black *et al.* (1992), foram utilizados de um a três clones por biótipo, e no de Aikhonbare *et al.* (1998), foram utilizados dois clones por biótipo, com exceção do biótipo E, para o qual foram analisados 20 clones. Aikhonbare *et al.* (1998) recomendaram que estudos usando marcadores tipo RAPD devem ter uma amostra maior em relação ao número de clones e uma amostragem de maior abrangência geográfica na amostragem.

2.2 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi selecionar marcadores RAPD que possam ser usados para identificação de biótipos de *S. graminum* como uma alternativa aos testes de respostas de plantas diferenciadoras. Também foi avaliadas a diversidade genética dentro de cada biótipo e as relações genéticas existente entre os biótipos B, C e E.

2.3 Material e Métodos

2.3.1 Obtenção de Linhagens Clonais

As linhagens foram obtidas a partir de clones coletados a campo em diversas regiões trítcolas do Brasil (Tabela 2.1). Estes insetos foram primeiramente multiplicados na Embrapa-Trigo, em Passo Fundo-RS, sob plântulas de trigo IAC5-Maringá, para a produção de linhagens clonais. As ninfas foram produzidas e transferidas para novas plantas para evitar uma possível contaminação por parasitóides ou vírus fitopatogênico (VNAC).

2.3.2 Identificação dos Biótipos e Conservação das Amostras

No presente trabalho, adotou-se a Técnica de Qualificação da Lesão para a identificação de biótipos, com ligeiras modificações dos procedimentos utilizados por Puterka & Peters (1988). As espécies e cultivares utilizados como coleção diferenciadora para a qualificação do nível de dano estão listados na Tabela 2.2. Dez a quinze sementes de cada fonte de resistência foram semeadas por vaso, que foram transferidos para uma câmara climatizada (21°C, 70% de umidade relativa e 12h de fotofase). Após uma semana, dez clones de afídeos de mesma idade (um dia) foram colocados nas plântulas e deixados por um período quatro dias para alimentação e após a eliminação desses clones, as folhas foram examinadas para verificar o desenvolvimento de lesão. As plantas foram consideradas suscetíveis quando houvesse o desenvolvimento de lesões necróticas e resistentes quando, no máximo, clorose (amarelecimento) fosse observada no local de alimentação dos afídeos. Foram realizados quatro repetições do bioensaio. A linhagem clonal oriunda de Minas Gerais e as provenientes dos Estados Unidos foram identificadas no local de origem.

As amostras foram conservadas em etanol 95% e usadas por um período de aproximadamente 3 a 12 meses para a extração de DNA.

Tabela 2. 1. Locais de coleta dos biótipos, plantas hospedeiras e código dos clones de *Schizaphis graminum graminum* do Brasil e Estados Unidos.

Local	Planta hospedeira	Código dos Biótipos
Passo Fundo, RS	Trigo	B3, C1

Santa Rosa, RS	Trigo	C3
Carazinho, RS	Trigo	C2
Santo Ângelo, RS	Trigo	C4
Cascavel, PR	Trigo	C7
Tapera, RS	Trigo	C6
São Borja, RS	Trigo	C5
Seberi, RS	Trigo	E1
Mal. Cândido Rondon, PR	Trigo	E2
Tibagi, PR	Trigo	C8
Itaporã, MS	Trigo	C9
Londrina, PR	Trigo	E3
Medianeira, PR	Trigo	E6
Panambi, MS	Trigo	E4
Caarapó, MS	Trigo	B1,B2
Dourados, MS	Trigo	E5
Sete Lagoas, MG	Sorgo	C10
Oklahoma, EUA	-	B4, C11, E7

Tabela 2.2. Coleção diferencial de hospedeiros utilizados na identificação dos biótipos de *Schizaphis graminum*.

Hospedeiro				
Biótipos				
Planta/Cultivar	B	C	E	
Trigo/DS28A	S	S	S	
Trigo/Amigo	R	R	S	
Trigo/Largo	R	R	R	
Centeio/Insave	R	R	R	
Aveia-Branca/PF9158	R	R	R	
Trigo/CI17882	R	R	R	
Trigo/BR36	R	R	S	
Trigo/BR-1	-	S	S	
Cevada/Will	S	R	R	
Cevada/Omugi	S	R	S	
Sorgo/KS-30	S	R	S	

R, resistente; S, suscetível; -, ausência de dados.

2.3.3 Extração do DNA

O protocolo utilizado para a extração de DNA foi o de Carvalho & Vieira (2001). Cinco clones de cada linhagem foram acondicionados em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml para maceração com 200 μ L do tampão de extração (200 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 M NaCl, 0,5M EDTA) e 50 μ L de sarcosyl. As suspensões resultantes foram colocadas em uma placa aquecedora a 65°C por 30 min e após, centrifugadas a 10000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi recolhido em um novo microtubo, onde foram adicionados 110 μ L de acetato de amônio e 250 μ L de isopropanol gelado para a precipitação do DNA. Essa solução foi guardada no congelador a -20°C por 8h. A seguir, os microtubos com os reagentes foram novamente centrifugados a 10000 rpm durante 15 min e o sobrenadante descartado. O “pellet” de DNA foi submetido a duas lavagens com etanol a 70% e re-suspendido pela adição de 25 μ L de tampão TE (Tris-EDTA, pH 8,0) contendo RNAase (10 μ g/mL) e estocado a -20 °C.

2.3.4 RAPD

As reações foram preparadas em microtubos de 0,6 mL em volume total de 25 μ L para cada reação contendo tampão [20 mM Tris HCl (pH 8,4) , 50 mM de KCl], 3 mM de MgCl, 100 μ M de cada dNTP, 5 pmol de iniciadores, 1,0 U de *Taq* polimerase e aproximadamente 25 ng de DNA. As amplificações foram feitas utilizando-se o Termociclador PTC-100 (M.J. Research) com seguinte programa de temperaturas: 5 min a 94°C seguidos de 40 ciclos de 1min a 94°C, 1 min 30 s a 40°C e 3 min a 72°C, com extensão final de 5 min a 72°C. As amplificações foram analisadas em eletroforese a 5V/cm em gel de agarose (1,5%) e 0,5 X de Tris-Borato-EDTA, sendo coradas em brometo de etídio (0,5 μ g/ml). Os géis foram visualizados e fotografados utilizando-se o sistema

KODAK EDAS 120. Foram testados iniciadores da série OPA (exceção de OPA-04, OPA-06, OPA-16, OPA-19 e OPA-20) três da série OPC (OPC-02, OPC-09, OPC-13) e um da série OPD (OPD-03).

2.3.5 Análise de Dados

Apenas fragmentos menores que 2,5 kb e reproduzíveis em dois ou mais géis foram considerados para a análise. Utilizou-se o coeficiente de similaridade de Jaccard (Sneath & Sokal 1973) para o cálculo das similaridades genéticas entre as linhagens clonais, conforme a seguinte fórmula: $S_{1,2} = a/(a+b+c)$ onde:

a = número de bandas presentes em ambas as linhagens,

b = número de bandas presentes na linhagem 1, mas não na linhagem 2,

c = número de bandas presentes para linhagem 2, mas não na linhagem 1.

O método utilizado para a construção do dendrograma foi o UPGMA (Unweighted Paired Group with Arithmetic Mean) (Sneath & Sokal 1973).

A Análise da Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992) foi empregada com o objetivo de investigar a magnitude da variação genética entre biótipos e regiões de coleta (Estados). Para esta análise, foram excluídas as linhagens clonais B4, C11 e E7 por serem oriundas dos Estados Unidos e C10 por ser a única linhagem clonal coletada em Minas Gerais. Foram realizadas duas análises de AMOVA em dois arranjos: Estados (linhagens clonais dentro de Estados) e biótipos (linhagens clonais dentro de biótipos) para avaliar a contribuição da origem geográfica e do biótipo na variabilidade genética das linhagens. Empregou-se o programa AMOVA-PREP (Miller 1998) e WINMOVA versão 1.55 (Excoffier *et al.* 1992). Nestas análises foi obtido o valor para o índice Φ_{st} (Excoffier

et al. 1992), que é correlacionado com o índice de fixação, o “F-statistics” (F_{st}), para quantificar o nível de diferenciação genética oriunda da divisão de uma população.

2.4 Resultados e Discussão

2.4.1 Identificação dos Biótipos

Dos dezenove iniciadores arbitrariamente escolhidos, apenas seis produziram polimorfismos, dos quais, três foram discriminantes para biótipos (Figuras 2.1, 2.2 e 2.3). O iniciador OPA-3 foi capaz de diferenciar o biótipo B pela presença de um fragmento de 550 pb (pares de base), o qual é ausente em C e E e pela presença de um fragmento de 750 pb em C e E, mas ausente em B (Figura 2.1). O iniciador OPA-7 permitiu discriminar todos os três biótipos brasileiros, mas não foi capaz de distinguir as linhagens clonais C e E dos Estados Unidos (C11 e E7) (Figura 2.2). O iniciador OPC-2 foi capaz de discriminar o biótipo C do E pela presença de um fragmento 1.000 pb em todas as linhagens clonais do biótipo E examinadas e ausentes das linhagens clonais do biótipo C e biótipo B (Figura 2.3). Black *et al.* (1992) relataram que os marcadores RAPD não foram capazes de distinguir os biótipos C e E, o que contrasta com os resultados de Aikhonbare *et al.* (1998) que demonstraram que o RAPD foi capaz de produzir polimorfismos distintos para C e E.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que os biótipos brasileiros de *S. graminum* podem ser prontamente identificados, mesmo com iniciadores diferentes daqueles usados por Aikhonbare *et al.* (1998). Comparado com o método de reações de plantas para a identificação dos biótipos, o RAPD é mais rápido, barato e menos trabalhoso.

2.4.2 Relações Genéticas

A análise de UPGMA mostrou três grupos: Grupo I, formado pelas linhagens do biótipo B; Grupo II, formado exclusivamente pelo biótipo C e Grupo III, formado pelas linhagens clonais dos biótipos C e E (Figura 2.4). Em estudos filogenéticos moleculares (Shufran *et al.* 2000), o biótipo B ocupa um diferente clado dos biótipos agrícolas (C-E-I-K).

O primeiro registro do biótipo B no Brasil aconteceu em 1998 (Tonet 1999) e desde então, apenas três linhagens clonais foram coletadas no ano de 2000 (as mesmas utilizadas neste trabalho), sendo que estas linhagens foram coletadas em dois locais muito distantes entre si (Caarapó - MS e Passo Fundo - RS).

Apesar de não se descartar a possibilidade desta pequena variabilidade observada entre as linhagens clonais do biótipo B ser devida ao pequeno número de amostras coletadas, a reprodução exclusivamente anolocíclica (Puterka & Peters 1990) e sua associação a hospedeiros selvagens (Anstead *et al.* 2002) pode ter contribuído para a baixa variabilidade entre linhagens clonais oriundos de regiões separadas por uma grande distância..

O biótipo C apresentou a maior variabilidade genética intra-biotípica. Foi observada uma associação entre perfil de bandas e a origem geográfica dos clones. Todas as linhagens clonais coletadas no Rio Grande do Sul (C1, C2, C3, C4 e C6) tiveram perfis idênticos, exceto a linhagem C5. O clone que originou esta população foi coletado em um local distante dos outros. Os clones C7 e C8, coletados no Paraná mostraram a maior divergência genética entre as linhagens clonais dentro do grupo II.

Todas as linhagens clonais do biótipo E e três linhagens clonais do biótipo C formaram o grupo III. Com exceção de E5 e E7, todas as outras linhagens do biótipo E tiveram o mesmo perfil de fragmentos RAPD. A linhagem clonal C10 (Sete Lagoas - MG)

foi coletada em sorgo e teve o padrão mais distinto dos biótipos C brasileiros. C11 e E7 oriundas do laboratório do ARS-USDA (Stillwater - OK), foram geneticamente similares entre si. C9, oriunda de trigo (Itaporã - MS); C10, coletada em sorgo e, C11 mostraram-se mais relacionadas com linhagens clonais do biótipo E do que com as outras linhagens do biótipo C. Como esperado, a linhagem clonal E7 dos Estados Unidos apresentou uma pequena, mas significativa divergência de todas as linhagens brasileiras do biótipo E. Este resultado não está de acordo com os trabalhos anteriores que mostram a falta de variabilidade genética dentro dos clones do biótipo E usando RAPD (Black *et al.* 1992, Aikhonbare *et al.* 1998). Apesar da alta similaridade genética, foi possível encontrar um marcador específico para a linhagem clonal de E dos Estados Unidos, mesmo com o uso de um número limitado de iniciadores (Fig. 2.4). Este resultado sugere a possibilidade de encontrar maior variabilidade genética em linhagens clonais do biótipo E de diferentes origens geográficas com o aumento do número de iniciadores. Anteriormente, a diferenciação genética entre os clones de biótipo E foi apenas obtida usando-se espaçadores intergênicos do DNA ribossomal, que são regiões de alta variabilidade (Shufran *et al.* 1992). A análise de agrupamento mostrou que algumas linhagens clonais do biótipo C são mais relacionadas com o biótipo E. Usando a análise de isoenzimas, Abid *et al.* (1989) relatou padrões indistintos entre C e E. Apesar da fácil identificação dos biótipos B, C e E através de marcadores RAPD, as similaridades genéticas entre C e E não apóiam a hipótese de que estes biótipos sejam grupos divergentes evolutivamente.

Houve uma concordância entre os resultados de RAPD com aqueles obtidos com estudos do DNA mitocondrial com respeito aos relacionamentos genéticos. Shufran *et al.* (2000) usando sequências parciais de citocromo-oxidase subunidade I do mtDNA, posicionou o biótipo B em um clado diferente de C e E. De forma semelhante, Aikhonbare

& Mayo (2000) usando quatro outros genes mitocondriais mostraram que o biótipo B é pouco relacionado com C e E. A análise do relacionamento genético com marcadores RAPD mostrou que o biótipo B parece ser um grupo naturalmente divergente de C e E, apresentando baixa variação intra-biotípica. Este fato pode ser uma consequência do isolamento genético, pois o biótipo B é exclusivamente partenogênético no Estados Unidos (Puterka & Peters, 1990).

M Cn B2 B1 B3 B4 C1 C5 C7 C8 C9 C10 C11 E1 E4 E7

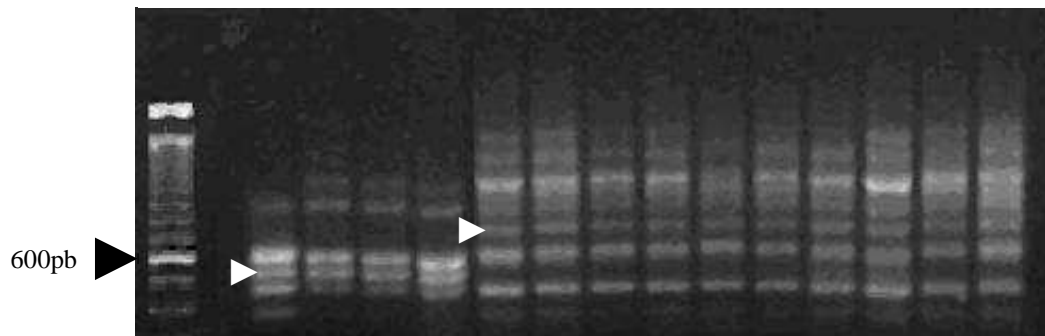


Figura 2.1. Perfis eletroforéticos RAPD de biótipos B, C e E de *Schizaphis graminum* obtidos com iniciador OPA-3. B2-B4, biótipos B; C1- C11, biótipos C; E1-E7, biótipos E; M, marcador de 100 pb; Cn, controle negativo. Setas brancas indicam as bandas diferenciadoras.

L Cn B1 B4 C1 C3 C5 C6 C7 C8 C9 C10 C11 E1 E3 E5 E7

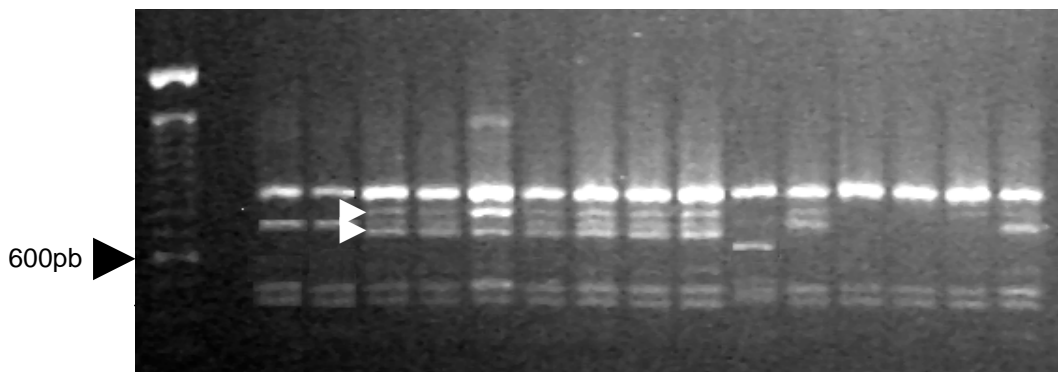


Figura 2.2. Perfis eletroforéticos RAPD de biótipos B, C e E de *Schizaphis graminum* obtidos com o iniciador OPA-7. B1 - B4, biótipos B, C1-C11 biótipos C; E1-E7, biótipos E; M, marcador de 100 nb; Cn, Controle negativo. Setas brancas indicam

L Cn C8 C9 C10 C11 E1 E5 E6 E7

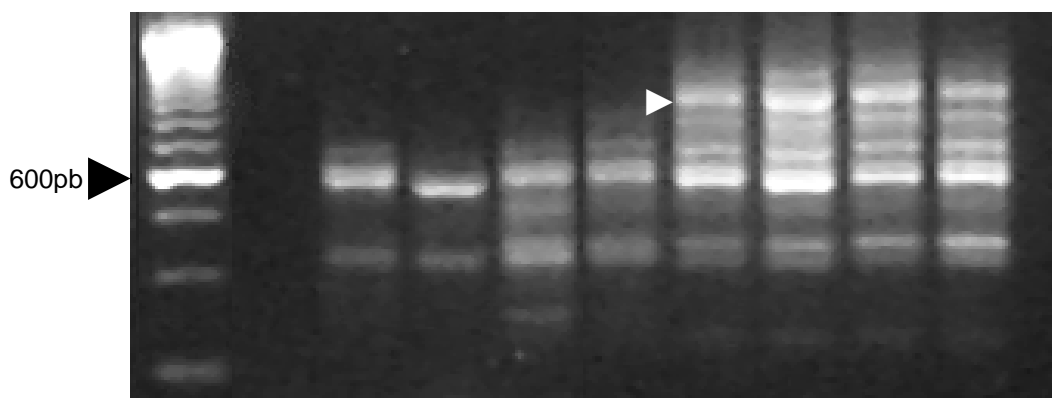


Figura 2.3. Perfis eletroforéticos RAPD de biótipos C e E de *Schizaphis graminum* obtidos com o iniciador OPC-2; C8-C11, biótipos C; E1-E7, biótipo E; L, marcador de 100pb, Cn, controle negativo. A seta branca indica a banda diferenciadora.

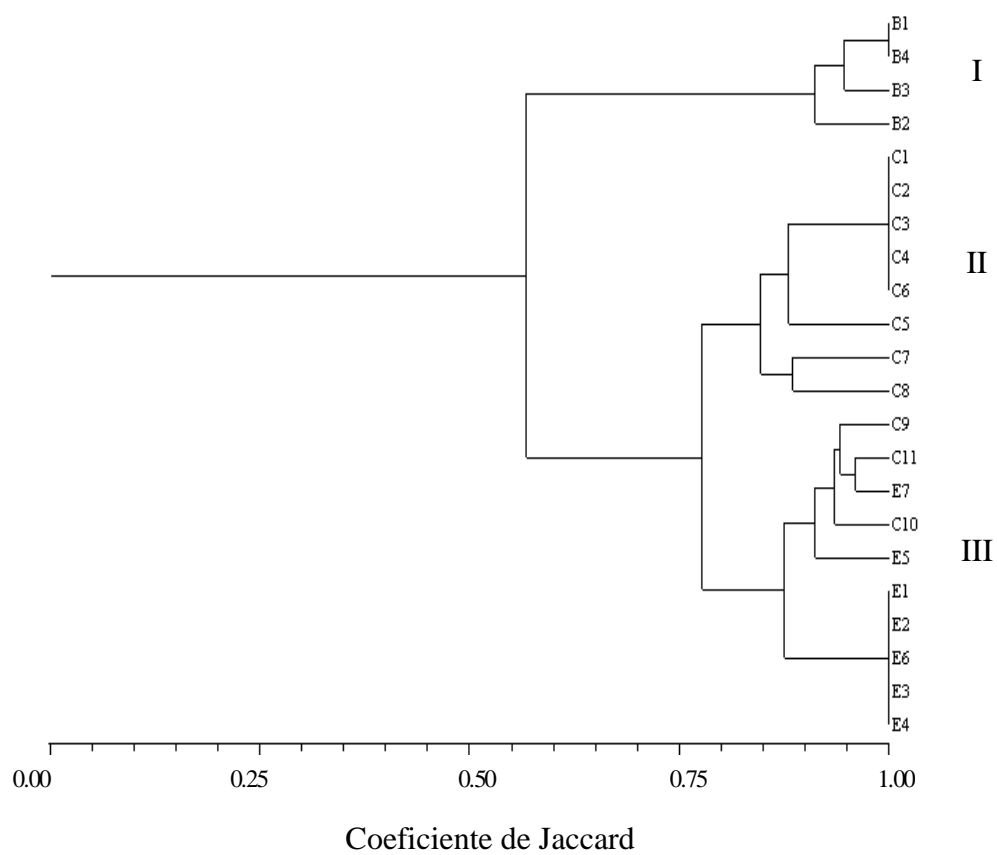


Figura 2.4. Dendrograma do relacionamento genético entre os biótipos B, C e E de *Schizaphis graminum* obtido com o método de agrupamento por UPGMA e baseado em perfis de RAPD gerados por seis iniciadores. Valor de escala de 1,0 indica 100% de similaridade genética. Códigos dos biótipos de acordo com a Tabela 2.1.

2.4.3 Análise da Variância Molecular (AMOVA)

A análise da variância molecular em dois níveis está mostrada na Tabela 2.3. A variabilidade genética dentro de biótipos foi menor que a variância dentro de Estados (16,12 % e 79,37 %, respectivamente). Isto implica que biótipo contribui mais para a similaridade genética entre linhagens clonais que a origem geográfica. Em termos estatísticos, isto poderia ser explicado como a consequência da similaridade observada genética dentro de B e E. Apesar das diferentes origens geográficas, linhagens clonais dos biótipos B e E apresentam baixa variabilidade genética, sendo também muito distantes geneticamente entre si. O alto valor de Φ_{st} (0,839) obtido quando as linhagens clonais foram agrupadas por biótipo indica alta divergência genética entre linhagens do biótipo B e linhagens dos biótipos C e E. Embora apresentando um menor valor de Φ_{st} (0,203) quando as linhagens foram agrupadas dentro de Estados, uma relativa estruturação genética foi encontrada, causada principalmente pela ausência de variabilidade genética entre as

linhagens clonais do RS. Um valor acima de 0,15 já indica estruturação genética (Wright *apud* Hartl & Clark 1997).

Baseado na afirmação de que a maior parte dos pulgões de cereais de inverno do RS é originária de regiões mais ao norte do Brasil (Caetano 1973), a baixa diversidade genética de *S. graminum* do RS poderia ser resultado de um processo recente de subdivisão das populações migrantes. Quando uma população é subdividida, cada população resultante torna-se mais homogênea e divergente da população original devido aos efeitos fundadores, seleção diferencial ou deriva genética (Hartl & Clark, 1997).

Tabela 2.3. AMOVA de linhagens clonais agrupadas por locais de coleta dentro de Estados e Biótipos.

Agrupamento	Componente da variação genética (%)		Φ_{st}	P (valor)
	Entre	Dentro		
Estados	20,3	79,4	0.203	< 0.001
Biótipo	83,9	16,1	0.839	< 0.006

Outra hipótese a ser considerada é a seleção natural causada por inimigos naturais, que poderia ser responsável por diferenças na composição genética de populações residentes em um determinado local. Até 1992, de acordo com Salvadori & Tonet (2001), 74% de toda as populações de parasitóides criadas na Embrapa-Trigo para o Programa de Controle Biológico de Pulgões foram liberadas no RS. No Estado de Nova York, Henter & Via (1995) relatam seleção no pulgão da ervilha, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) causado por agente de controle biológico. Assim, uma alta taxa de parasitismo pode reduzir a diversidade genética, o que poderia explicar a homogeneidade genética da população do biótipo C do RS.

2.5 Conclusões

- A análise por marcadores RAPD é útil para identificar biótipos de *S. graminum* do Brasil usando apenas um limitado conjunto de iniciadores.

- As linhagens clonais do biótipo B ocorrentes no Brasil são geneticamente muito distintas de C e E, sendo estes dois biótipos mais próximos geneticamente entre si.
- Linhagens clonais de *S. graminum* pertencentes ao mesmo biótipo tem maior similaridade genética que linhagens clonais agrupadas por sua origem geográfica.

Literatura Citada

Abid, H.S.; S.D. Kindler; S.G. Jensen; M.A. Thomas-Crompton & S.M. Spomer. 1989. Isozyme characterization of sorghum aphid species and greenbug biotypes (Homoptera: Aphididae). *Annals of Entomological Society of America* 82: 303-306.

Aikhionbare, F.O.; K.P. Pruess; K.P. & Z.B. Mayo. 1998. Greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes characterized using random amplified polymorphic DNA. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 14: 105-108.

Aikhionbare, F.O. & Z.B. Mayo. 2000. Mitochondrial sequences of greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 16: 199-205.

Anstead, J.A.; J.D. Burdon & K.A. Shufran. 2002. Mitochondrial DNA sequence divergence among *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae) clones from cultivated

and non-cultivated hosts: haplotype and host associations. *Bulletin of Entomological Research* 92: 17-24.

Beregovoy, V. & D.C. Peters. 1995. Efficiency of host-plant use by 8 biotypes of *Schizaphis graminum* (Aphididae: Homoptera). *Journal of Kansas Entomological Society* 69: 69-73.

Black, W.C.; N.M. DuTeau; G.J. Puterka; J.R. Nechols & J.M. Pettorini. 1992. Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* 82: 151-159.

Bush, L.; J.E. Slosser; W.D. Worrall & G.J. Puterka. 1987. Status of greenbug biotypes in Texas. *Southwestern Entomology* 12: 229-236.

Caetano, V. R. 1973. Estudos sobre os afídeos vetores do Vírus do Nanismo Amarelo da Cevada, em especial de *Acyrtosiphon dirhodum*, em trigo no Sul do Brasil. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 104p.

Campbell, B.C. 1986. Host-plant oligosaccharins in the honeydew of *Schizaphis graminum* (Rondani) (Insecta, Aphididae). *Experientia* 42:451-452.

Campbell B.C. & D. L. Dreyer. 1985. Host-plant resistant of sorghum: differential hydrolysis of sorghum pectic substances by polysaccharases of greenbug biotypes (*Schizaphis graminum*, Homoptera: Aphididae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 2: 203-215.

Carvalho, A.O.C. & L.G.E. Vieira. 2001. Determinação das condições ótimas para análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel. (Hymenoptera: Formicidae) Neotropical Entomology 30: 593-600.

Eisenbach, J. & T. E. Mittler. 1980. An aphid circadian rhythm: factors affecting the release of sex pheromone by oviparae of the greenbug, *Schizaphis graminum*. Journal of Insect Physiology 26:511-515.

Eisenbach, J. & T. E. Mittler. 1987. Extra-nuclear inheritance in a sexually produced aphid: the ability to overcome host plant resistance by biotype hybrids of the greenbug, *Schizaphis graminum*. Experientia 43:332-334.

Excoffier, L.; P.E. Smouse & J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. Genetics 131: 479-491.

Hartl, D.L. & A.G. Clark. 1997. Principles of population genetics. 3rd edition. Sunderland (MA), Sinauer Associates, 481p.

Harvey, T.L & H.L. Hackerott. 1969. Plant resistance to a greenbug biotype injurious to sorghum. Crop Science 9: 656-658.

Harvey, T.L.; K.D. Kofoid; T.J. Martin & P. E. Slordebeck. 1991. A new greenbug virulent to E biotype resistant sorghum. Crop Science 31: 1689-1691.

Harvey, T. L.; G.E. Wilde & K.D. Kofod. 1997. Designation of a new greenbug, biotype K, injurious to resistant sorghum. Crop Science 37: 989.

- Henter, H. & S. Via. 1995. The potential for coevolution I. Genetic variation in susceptibility of pea aphids to a wasp parasitoid. *Evolution* 49: 427-438.
- Kerns, D.L.; D. C. Peters & G.J. Puterka. 1987. Greenbug biotype and sorghum seed sales surveys in Oklahoma, 1986. *Southwestern Entomology* 12: 237-243.
- Kindler, S. D. & S. M. Spomer. 1986. Biotypic status of six greenbug (Homoptera:Aphididae) isolates. *Environmental Entomology*. 15: 567-572
- Miller, M.P. 1998. AMOVA-PREP freeware version 1.01 in mpm@nauvaux.ucc.nau.edu
- Painter, R.H & D. C. Peters. 1956. Screening wheat varieties and hybrids for resistance to greenbug. *Journal of Economic Entomology* 49: 546-548.
- Porter, K.B.; Peterson, J.L. & Vise. 1982. A new greenbug biotype. *Crop Science* 22: 847-850
- Porter, D.R.; J.D. Burd; K.A. Shufan; J.A. Webster & G.L. Teetes. 1997. Greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes: selected by resistant cultivars or preadapted opportunists. *Journal of Economic Entomology* 90: 1055-1065.
- Puterka, G.J. & D.C. Peters. 1988. Rapid technique for determining greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes B, C, E and F. *Journal of Economic Entomology* 81: 396-399.
- Puterka, G.J. & D.C. Peters. 1990. Sexual reproduction and inheritance of virulence in the greenbug *Schizaphis graminum* (Rondani), p.289-317. In: Campbell, R.K & R.D. Eikenbary (eds.). *Aphid-plant genotype interactions*, Amsterdam, Elsevier, 378p.

Puterka, G. J.; D.C. Peters; J. E. Kerns; J.E. Slosser; L. Bush; W.D. Worrall & R.W. McNew.1988. Designation of two new greenbug (Homoptera:Aphididae) biotypes G and H. *Journal of Economic Entomology* 81: 1754-1759.

Puterka, G. J. & J. E. Slosser.1983. Inducing oviparae and males of biotype C greenbugs *Schizaphis graminum* (Rondani). *Southwestern Entomology* 8: 268-272

Rubin-de-Celis,V. E.; D.N. Gassen; S. M. Callegari-Jacques; V. L. S. Valente & A. K. Oliveira. 1997. Morphometric observations on three populations of *Schizaphis graminum* (Rondani), a main wheat aphid pest in Brazil. *Anais da Sociedade Entomológica Brasileira*. Brasil: Sociedade de Entomologia do Brasil. 26: 417-428.

Salvadori, J. R. & G.E.L. Tonet. 2001. Manejo integrado dos pulgões do trigo. Embrapa-Trigo, Passo Fundo, 52p.

Shufran, K.A.; D.C. Margolies & W.C. Black. 1992. Variation between biotype E clones of *Schizaphis graminum* (Homoptera:Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* 82: 407-416.

Shufran, K.A.; J.D. Burd; J.A. Anstead & G. Lushai. 2000. Mitochondrial DNA sequences divergence among greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes: evidence for host adapted races. *Insect Molecular Biology* 9: 179-184.

Sneath P.H.A & R.R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy; the principle and practice of numerical classification. V. H. Freeman, San Francisco, 537p.

Teetes, G. L.; C.A . Schaefer; J.R. Gipson; R.C. McIntrye & E.E. Latham. 1975. Greenbug resistance to organophosphorus insecticide on Texas High Plains. *Journal of Economic Entomology* 7: 877-880.

Tonet, G.E.L. 1999. Identificação de biótipos de *Schizaphis graminum* que ocorrem em cereais de inverno no Brasil. Anais da XVIII Reunião Nacional da Pesquisa de Trigo, Passo Fundo. p.590-595.

Capítulo 3: Estudo da Diversidade Genética Temporal de *Schizaphis graminum* (Hemiptera: Aphididae) por Meio de Marcadores RAPD

Capítulo 3: Estudo da Diversidade Genética Temporal de *Schizaphis graminum* (Hemíptera:Aphididae) por Meio de Marcadores RAPD em um ciclo fenológico de Aveia-Preta (*Avena strigosa*)(L.)

Resumo

Estudos da diversidade genética de afídeos em escala temporal podem contribuir para a compreensão dos fenômenos migratórios e de dispersão deste grupo de insetos. Resultados controversos têm sido observados em relação à variação da diversidade genética ao longo do tempo. Este trabalho teve como objetivo observar e avaliar a diversidade genética em *Schizaphis graminum* coletados em um mesmo local (Londrina-PR), durante um período de quatro meses (maio-agosto), por meio de marcadores RAPD. Para isso, clones de *S. graminum* foram coletados em uma lavoura de aveia-preta (*Avena strigosa*) e multiplicados em casa-de-vegetação. A diversidade de genótipos por mês foi calculada através do Índice de Informação de Shannon (H). Foi possível distinguir pelo menos quatro genótipos, sendo que um destes foi predominante no total das coletas (> 60%). Um outro genótipo, aparentemente colonizador tardio, alcançou rapidamente uma alta frequência nas coletas de junho e julho, possivelmente devido à grande dispersão para dentro da área de estudo. A

partir do mês de junho não houve alterações importantes na diversidade genética dos afídeos presentes na área estudada, havendo apenas a alternância da abundância relativa entre os dois genótipos mais comuns. Os outros dois genótipos apresentaram baixa frequência, o que parece indicar menor valor adaptativo dos mesmos. Os resultados deste trabalho sugerem que a diversidade genética temporal de *S. graminum* foi influenciada pela dispersão, pelo efeito fundador e pela seleção natural.

Palavras-Chave: Pulgão, aveia-preta, escala temporal, genótipos.

Chapter 3: Study of Temporal Genetic Diversity of *Schizaphis graminum* Rond. (Hemiptera:Aphididae) by RAPD Markers in a Phenological Cycle of Black Oats (*Avena strigosa*)

Abstract

Studies of genetic diversity in aphids in a temporal scale may contribute to understand migration and dispersion phenomena within this insect group. Controversial results have been observed regarding of genetic diversity variation at temporal scale. The objective of this work was to observe and assess genetic diversity of *Schizaphis graminum* clones collected in a single site within a period of four months (May-August) using RAPD markers. The *S. graminum* clones were collected from an area cultivated with black oats (*Avena strigosa*) and multiplied in greenhouse. The genotype diversity was calculated using Shannon Information Index (H). It was possible to distinguish at least four genotypes, with one of them being highly predominant in all sampling dates (>60%). Another genotype, apparently a later colonizer, rapidly reached high frequency in June and July samplings probably due to a high dispersion within the studied area. From June on, no substantial variation on aphid genetic diversity was detected, with only an alternation in abundance between the two most common genotypes being observed. The other two genotypes had

lower frequency throughout the study period, probably due to their lower fitness. The results suggested that temporal genetic diversity of *Schizaphis graminum* was influenced by dispersion, founder effect and selection.

Key words: Aphid, oats, temporal scale, genotypes

3.1 Introdução

Muitos dos aspectos da ecologia populacional de afídeos podem ser melhor compreendidos por estudos de diversidade genética. A utilização de marcadores RAPD e microssatélites têm facilitado o desenvolvimento de trabalhos nesta linha de pesquisa (Llewellyn *et al.* 2003).

Em escala temporal, os estudos sobre a diversidade genética de afídeos têm demonstrado resultados controversos. Em alguns casos, não foi observada modificação substancial na diversidade genética em um mesmo local (Shufran *et al.* 1991), enquanto em outros houve uma variação significativa (Guillemaud *et al.* 2003, Massonet & Weisser 2004). As conclusões discordantes podem ser conseqüências da metodologia de amostragem, do tamanho da amostra, dos marcadores populacionais utilizados, das espécies estudadas e das condições locais. Por exemplo, os estudos de Martinez-Torres *et al.* (1997) com *Rhopalosiphum padi* (L.), não apontam variação sazonal na diversidade genética desta espécie, contrariamente ao que Nicol *et al.* (1997) encontraram para *Metopolophium dirhodum* (Walker). Os primeiros autores utilizaram freqüências de haplótipos mitocondriais e os segundos utilizaram marcadores RAPD. Marcadores considerados muito eficientes para este tipo de estudo, como os microssatélites mostraram diferenças de ano

para ano nas frequências de alelos, em um mesmo local, em *Sitobion avenae* (F.) (Llewellyn *et al.* 2003).

Os estudos visando à elucidação dos padrões migratórios em afídeos dependem muito da informação sobre o comportamento da diversidade genética dentro de uma escala temporal. Das espécies importantes como pragas de cereais, apenas *S. avenae* tem merecido atenção a este respeito (Sunnucks *et al.* 1997). *Schizaphis graminum*, considerada a espécie de maior potencial de dano aos cereais nas Américas, tem sido alvo de estudos visando à compreensão da evolução de biótipos (Anstead *et al.* 2002), mas os aspectos de sua dinâmica populacional têm sido negligenciados (Puterka & Peters 1990).

Nos Estados Unidos, Shufran *et al.* (1991) demonstraram haver uma variação na diversidade genética de *S. graminum* associada com o tamanho populacional apenas em trigo. Em sorgo, a diversidade é estável na escala temporal, independentemente da variação de tamanho populacional. No Brasil, ainda não houve nenhum estudo voltado para a variação temporal em um mesmo local. Caetano (1973) propôs a ocorrência de migração de afídeos em função do plantio escalonado de trigo. Segundo esta proposição, no sul do Brasil, a infestação de lavouras de cereais seria principalmente de colonizadores vindos de regiões mais ao norte. Entretanto, Lopes-da-Silva *et al.* (2004) considera a possibilidade de que clones residentes permanentes próximos às áreas de cultivo de cereais sejam os principais colonizadores, senão os únicos. Estes autores também apontam a existência de um perfil RAPD único e diferenciado do biótipo C de *S. graminum* no Rio Grande do Sul como um indicativo desta condição. O desconhecimento de hospedeiros silvestres de *S. graminum* no sul do Brasil torna a questão ainda mais complexa.

Estudos sobre a variação na diversidade genética em escala temporal podem contribuir para aumentar o entendimento do padrão migratório de *Schizaphis graminum* no Brasil. Esta informação é relevante para o controle deste inseto.

3.2. Objetivo

Este trabalho teve como objetivo caracterizar e quantificar a diversidade genética entre clones de *S. graminum* coletadas em um mesmo local, ao longo do tempo usando marcadores RAPD.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Coleta

Os clones de *S. graminum* foram coletados em uma lavoura de aveia-preta cv. Iapar-61, situada em área experimental do Instituto Agronômico do Paraná, em Londrina-PR. A coleta foi concentrada em uma área de aproximadamente 2.500 m² (50x50 m), com frequência de coletas de uma a três vezes por semana, conforme a abundância dos espécimes, durante o período de maio ao final de agosto de 2003. O tamanho da área foi definido arbitrariamente em função da infestação inicial encontrada.

Preferencialmente, coletou-se uma ninfa do agrupamento de ninfas menores junto às fêmeas partenogênicas, assumindo que estas pertencessem à mesma linhagem clonal. Também foram coletadas fêmeas ápteras ou aladas isoladas.

3.3.2 Multiplicação e Conservação dos Clones

De 164 clones, descartaram-se 41 por problemas de parasitismo, fungos e falhas na inoculação, resultando na multiplicação de 123 linhagens clonais (Tabela 3.1). Os clones

coletados foram levados para casa-de-vegetação e depositados com auxílio de um pincel sobre plântulas de trigo cv. IAC-5-Maringá, plantadas em vasos (Figura. 3.1a). Essas plântulas foram protegidas por um cilindro de acrílico transparente de 65 x 25 cm (Figura 3.1b) recobertos com “voil” para evitar parasitismo e predação. De cada clone coletado, constituiu-se uma linhagem clonal que foi mantida até o momento em que parte dos clones era colocada em etanol a 95% e estocada a -20°C para extração do DNA.

Dez linhagens clonais oriundas de fêmeas coletadas no mês de agosto foram criadas sobre a cultivar de trigo EMBRAPA-16, que possui como um genitor, a variedade Amigo (suscetível ao biótipo E, resistente ao biótipo C), para identificar o provável biótipo ocorrente no local de estudo.

3.3.3 Extração do DNA

O protocolo utilizado para a extração de DNA foi o de Carvalho & Vieira (2001). Cinco clones de cada linhagem foram acondicionados em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL para maceração com 200µL do tampão de extração [200 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 M NaCl, 0,5 M EDTA] e 50 µL de sarcosyl. As suspensões resultantes foram colocadas em uma placa aquecedora a 65°C por 30 min e após, centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi recolhido em um novo microtubo, onde foram adicionados 110 µL de acetato de amônio e 250 µL de isopropanol gelado para a precipitação do DNA. Essa solução foi guardada no congelador a -20°C por 8h. A seguir, os microtubos com os reagentes foram novamente centrifugados a 10.000 rpm durante 15 min e o sobrenadante descartado. O pellet de DNA foi submetido a duas lavagens com etanol 70% e re-

suspendido pela adição de 25 μ L tampão TE (Tris-EDTA, pH 8,0) contendo RNAase (10 μ g/mL) e mantido a -20 °C.

A**B**

Figura 3.1. Sistema de multiplicação das linhagens clonais de *Schizaphis graminum* para o estudo de diversidade genética temporal. A, conjunto de vasos de multiplicação; B, vista em detalhe de um vaso de multiplicação.

3.3.4 RAPD

As reações foram preparadas em microtubos de 0,6 mL no volume total de 25 µL para cada reação contendo tampão [20mM Tris HCl (pH 8,4) , 50mM de KCl], 3mM de MgCl, 100 µM de cada dNTP, 5 pmol de iniciadores, 1,0 U de *Taq* polimerase e aproximadamente 25 ng-50 ng de DNA. As amplificações foram feitas utilizando-se o Termociclador PTC-100 (MJ Research) com seguinte programa de temperaturas: 5 min a 94°C seguidos de 40 ciclos de 1min a 94°C, 1 min 30 s a 40°C e 3 minutos a 72°C, com extensão final de 5 min a 72°C. As amplificações foram analisadas em eletroforese a 5V/cm em gel de agarose (1,5%) e 0,5 X TBE, sendo coradas em brometo de etídio a 0,5 µg/mL. Os géis foram visualizados e fotografados utilizando-se o sistema KODAK EDAS 120.

Inicialmente, foram testados os seguintes iniciadores: OPA-2, OPA-7, OPA-10, OPA-11, OPA-12, OPA-13, OPA-14 e OPC-2 em 10 amostras coletadas por mês. Destes,

foram selecionados os iniciadores OPA-2 e OPC-2, que detectaram polimorfismos reproduzíveis no teste inicial.

3.3.5 Análise dos Dados

Apenas fragmentos menores que 2,5 kb e reproduzíveis em dois ou mais géis foram considerados para a análise. Os genótipos foram definidos pela combinação dos polimorfismos gerados pelos dois iniciadores. A diversidade de genótipos por mês foi calculada através do Índice de Informação de Shannon (H) (Lewontin 1972), conforme a seguinte fórmula abaixo:

$$H = -\sum[(p_i)(\log_n p_i)],$$
 onde p_i é a frequência de determinado genótipo na amostra mensal.

Os cálculos foram realizados através do programa Shannon Calculator (www.changbioscience.com/genetics/shannon.html). Testes de Qui-quadrado (X^2) foram realizados para testar a existência de variação significativa nas frequências dos dois genótipos mais abundantes, conforme Lopes-da-Silva & Casagrande (2003).

3.4 Resultados e Discussão.

Com o uso dos dois iniciadores, foi possível distinguir quatro genótipos dentre as 123 linhagens clonais analisadas, identificados pelos códigos: Sg1, Sg2, Sg3 e Sg4. (Figura 3.4; Tabelas 3.1 e 3.2).

Neste trabalho, mesmo usando-se um número menor de iniciadores (dois) foi possível encontrar 40% da diversidade encontrada no trabalho de Lopes-da-Silva *et al.* (2004), que empregaram seis iniciadores. Utilizando metodologia diversa da empregada

neste trabalho (IGS -espaçadores intergênicos), Shufran *et al.* (1991) demonstraram que a maior parte da diversidade em uma escala macrogeográfica de *S. graminum* (> 80 %) pode ser encontrada em colônias presentes em uma única folha. Em outros trabalhos, o número de genótipos identificados por RAPD e encontrados em um mesmo local também é pequeno. Em *M. dirhodum*, com o uso de dois iniciadores, Nicol *et al.* (1997) distinguiram 5 genótipos em 142 amostrados clones amostrados. Na Inglaterra, Lushai *et al.* (2002) discriminaram 14 genótipos dentre 216 clones de *Sitobion avenae* usando apenas um iniciador. Entretanto, com o uso de 5 iniciadores, Figueroa *et al.* 2002 discriminaram 31 genótipos de 167 linhagens clonais de *Sitobion avenae*.

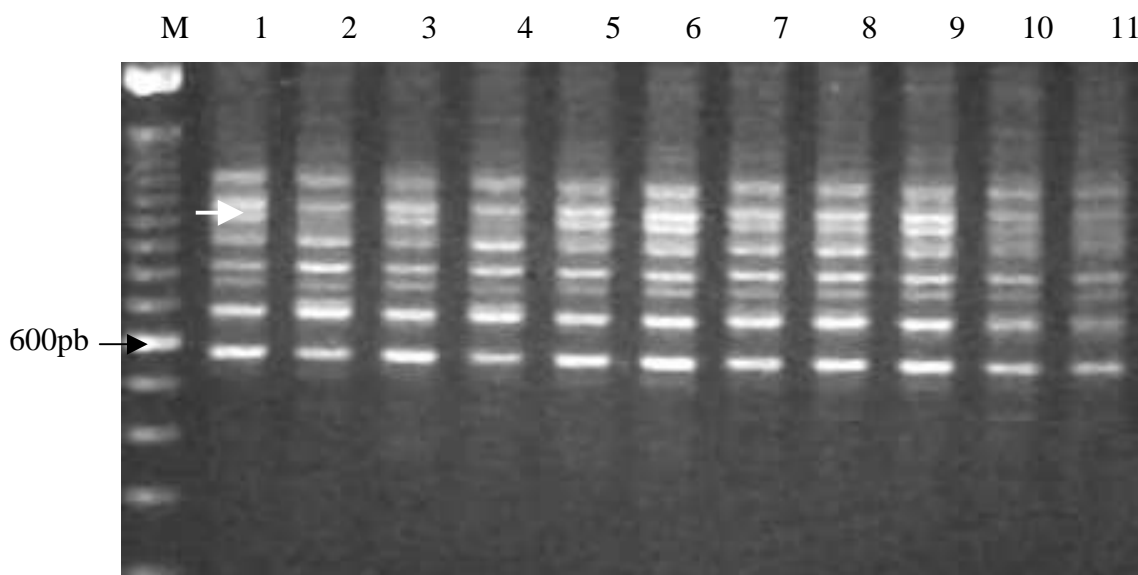


Figura 3.2. Perfis RAPD de linhagens clonais (1-11) de *Schizaphis graminum* coletados no mês de maio, obtidos com iniciador OPA-2. A seta branca indica a banda polimórfica de aproximadamente 1000 pb. M: marcador de 100 pb.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

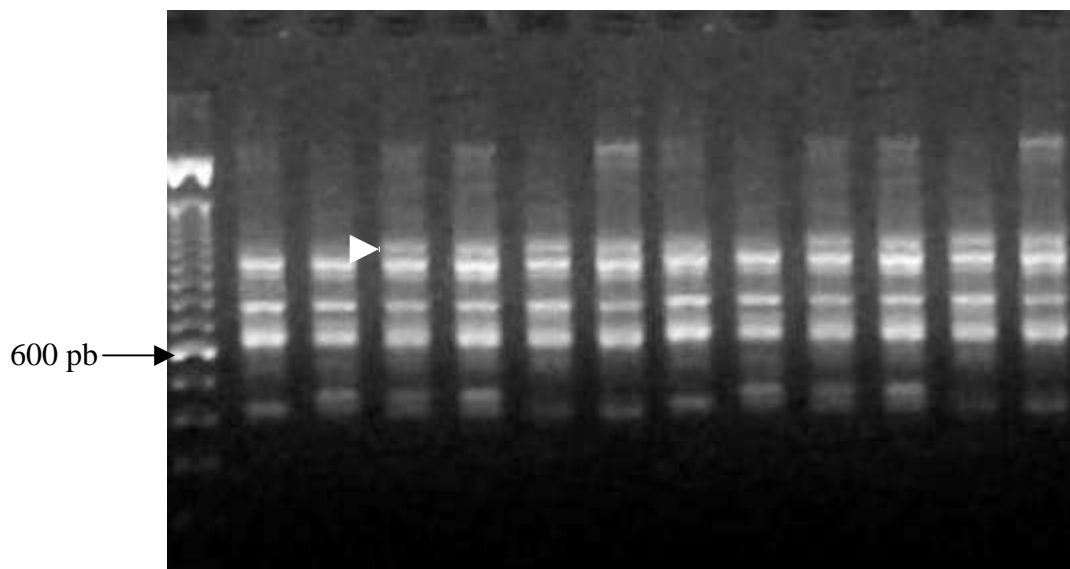


Figura 3.3. Perfis RAPD de linhagens clonais *Schizaphis graminum* (1-12) coletados no mês de junho de 2003, obtidos com o iniciador OPC-2. A seta branca indica a banda polimórfica, de aproximadamente 1100 pb. M: marcador de 100 pb.

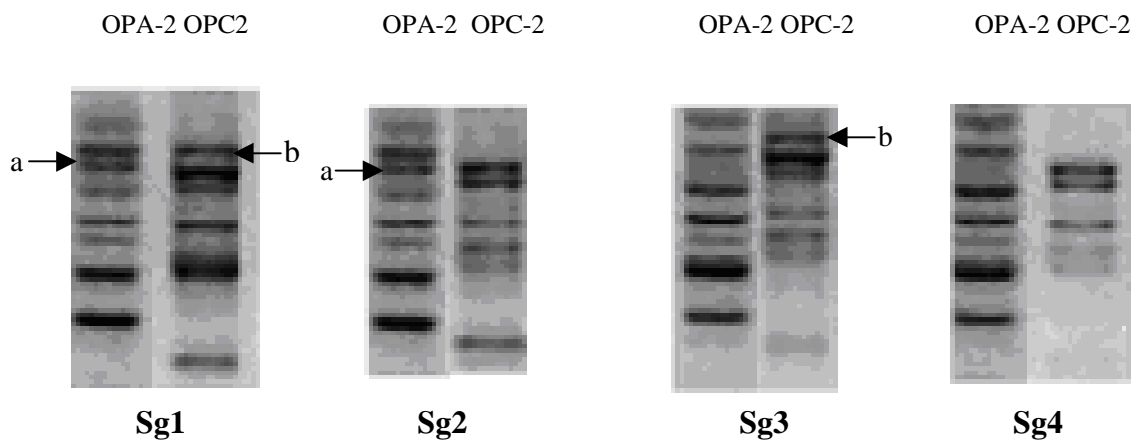


Figura 3.4 Perfis dos genótipos de *Schizaphis graminum* obtidos com iniciadores OPA-2 e OPC-2. a: banda de 1000 pb presente no perfil gerado pelo iniciador OPA-2, b: banda de 1100 pb presente no perfil gerado pelo iniciador OPC-2

Tabela 3.1. Distribuição do número de genótipos de *Schizaphis graminum* entre as amostras mensais no período de maio-agosto, 2003. Londrina-PR.

Genótipos/Meses	Maio	Junho	Julho	Agosto	Total por genótipo	%
Sg1	-	23	13	4	40	32,5
Sg2	27	26	9	13	75	61,0
Sg3	-	1	-	-	1	0,8
Sg4	5	1	-	1	7	5,7
Total mensal						
De clones	32	51	22	18	123	100,0

Tabela 3.2. Definição dos genótipos de *Schizaphis graminum* pelo polimorfismo gerado pelos iniciadores OPA-2 e OPC-2.

Genótipos	Bandas polimórficas
Sg1	Presentes: OPA-2, 1000 pb e OPC-2, 1100 pb.
Sg2	Presente: OPA-2, 1000 pb. Ausente: OPC-2, 1100 pb.
Sg3	Presente: OPC-2, 1100 pb. Ausente: OPA-2, 1000 pb.
Sg4	Ausentes: OPA-2, 1000 e OPC-2, 1100 pb

A identificação de biótipos de *S. graminum* no Brasil tem demonstrado uma grande variação de ano para ano na composição dos biótipos nas regiões tricultoras (Tonet 1999). Utilizando o iniciador OPC-2, que possibilita distinção do biótipo E do biótipo C (Lopes-da-Silva *et al* 2004), foram obtidos perfis de marcadores RAPD indicativos de que as linhas clonais coletadas neste trabalho pertenciam exclusivamente ao biótipo E de *S. graminum*. O teste de reação ao dano realizado com a cultivar EMBRAPA-16, confirmou que as linhagens clonais testadas são pertencentes ao biótipo E (Figura 3.5).

A presença de apenas um biótipo em uma determinada lavoura, ou, a maior frequência de um biótipo em uma região é considerado um fato comum em *S. graminum* nos Estados Unidos (Shufran *et al.* 1991, Shufran *et al.* 1992, Peters *et al.* 1997). O biótipo E é considerado o mais comum em lavouras de trigo na região das grandes pradarias (Kansas, Oklahoma, Missouri e parte do Texas) (Peters *et al.* 1997). No Brasil, segundo Tonet (comunicação pessoal), clones do biótipo E foram identificados até o ano de 1998.

Durante 1999-2000 não foram encontrados clones desse biótipo, sendo que estes voltaram a serem identificados somente em 2001 e 2002.

Houve o predomínio do genótipo Sg2, que também foi o único presente em todos os meses e em todas as coletas. A única exceção foi a predominância do genótipo Sg1, nas coletas efetuadas no mês de julho. O mês de junho foi o que apresentou a maior diversidade, não somente pelo fato da amostragem total desse mês ser a única que continha os quatro genótipos, mas também porque o genótipo Sg1 foi observado em uma frequência praticamente igual à do genótipo Sg2, o mais abundante na coleta total. Os valores de diversidade genética não sofreram alteração substancial a partir do mês de junho (Tabela 3.3).

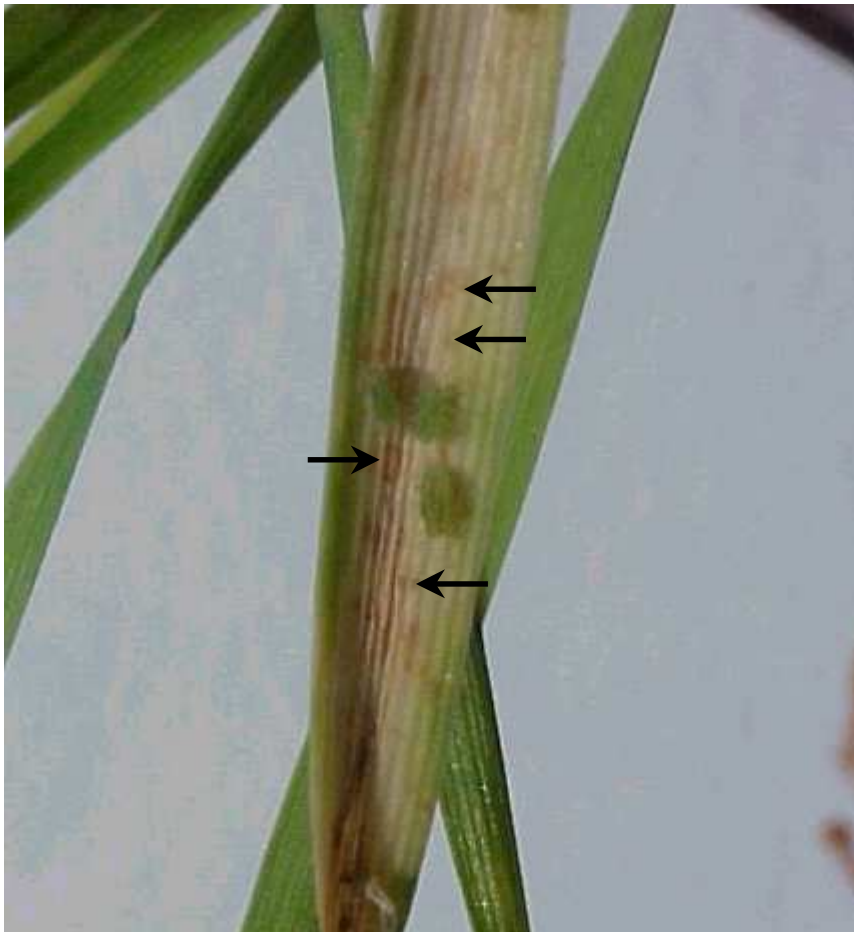


Figura 3.5 Reação de suscetibilidade da cultivar Embrapa-16 a uma linhagem clonal coletada no mês de agosto, obtida quatro dias após a inoculação de 10 fêmeas adultas. Setas indicam as lesões características de cultivares suscetíveis a *S. graminum*.

Tabela 3.3 Diversidade de genótipos obtidos por RAPD nas amostras de *Schizaphis graminum* coletadas no período de maio-agosto de 2003 em uma lavoura de aveia-preta (*Avena strigosa*) cv. IAPAR 61. Londrina-PR. H_m : Índice de Informação de Shannon para

diversidade genética mensal, H_t : Índice de informação de Shannon para a diversidade genética total do período.

Mês	H_m	H_t	% da H_t
Maio	0,441	-	50,7%
Junho	0,857	-	98,6%
Julho	0,670	-	77,1%
Agosto	0,730	-	84,0%
Período maio-agosto	-	0,869	100,0%

Uma das hipóteses que melhor explicaria a predominância do genótipo Sg2 viria do fato deste constituir-se um colonizador pioneiro. Assim, os genótipos pioneiros se

tornam abundantes em virtude da menor resistência ambiental nos estágios iniciais de colonização, em razão principalmente da ausência de parasitóides e predadores. Como consequência, a população fundadora terá muita importância na constituição da diversidade genética temporal e espacial (Nicol *et al.* 1997).

O segundo genótipo mais comum, Sg1, foi somente detectado na amostragem de junho, mas já alcançando alta frequência em comparação com os outros três genótipos. Entretanto, não é significativa a diferença entre frequências de Sg1 e Sg2 na amostra de julho em relação às frequências na amostra de junho ($X^2 = 0.90$, $p=0.34$, G.L.=1). Isto sugere que a melhor explicação para o rápido aumento de Sg1 no mês de junho seja a ocorrência de uma grande dispersão deste genótipo para dentro da área de estudo. Entre os meses de julho e agosto houve uma importante variação da diversidade genética encontrada na área em estudo, pois o genótipo Sg2 passou a ser mais abundante que o Sg1 ($X^2 = 4.92$, $p=0.04$). Além do movimento de dispersão, a variação na frequência de genótipos pode ser uma consequência de seleção ou deriva genética (Guillemaud *et al.* 1997, Massonet & Weisser, 2004). Como a seleção acarreta diminuição da diversidade genética (Guillemaud *et al.* 1997), o efeito da deriva explicaria melhor a diminuição do genótipo Sg1 na amostra de agosto, pois a diversidade (H_m) não foi substancialmente alterada (Tabela 3.3). O efeito de seleção poderia apenas ser responsável pela manutenção da baixíssima frequência dos genótipos mais raros, Sg3 e Sg4. A redução da população não ocasionou variação na diversidade genética (Tabela 3.3), resultado compatível com o observado por Shufron *et al.* (1991) em *S. graminum*. A diversidade genética estabilizou-se a partir do mês de junho, após a dispersão de um novo genótipo para dentro da área de estudo. Assim, é possível que a estabilidade encontrada possa ser devida a uma

colonização contínua. Pela abundância do primeiro genótipo observado, é demonstrada a influência do evento fundador na diversidade genética temporal.

Também foi observado que, mesmo em uma pequena área de cultivo, pode ocorrer mais de uma linhagem clonal de *S. graminum* pertencentes a um mesmo biótipo (E). A existência de diversidade genética em um mesmo local é uma informação importante para o manejo de *S. graminum*, pois este fato aumenta a probabilidade de ocorrência de seleção pelo emprego de métodos de controle ao longo do tempo.

3.5 Conclusões

- O genótipo de *S. graminum* mais abundante durante todo o período de estudo foi também o predominante desde o início da coleta, indicando a importância do efeito fundador na diversidade genética temporal.
- O segundo genótipo mais abundante pode ser considerado como colonizador tardio, alcançando alta frequência nas coletas possivelmente devido a uma grande dispersão para dentro da área de estudo e não por melhor adaptação.
- A partir do mês de junho não houve alteração importante na diversidade genética, havendo alternância significativa de predominância entre os dois genótipos mais abundantes apenas entre o mês de julho e agosto, possivelmente causados pelo efeito de deriva genética.
- A baixa frequência de dois genótipos durante todo o período de coleta indica a existência de seleção.

Literatura citada

Anstead, J. A.; J. D. Burdon & K. A. Shufran. 2002. Mitochondrial DNA sequence divergence among *Schizaphis graminum* (Hemiptera: Aphididae) clones from cultivated and non-cultivated hosts: haplotype and host associations. *Bulletin of Entomological Research* 92: 17-24.

Caetano, V. R. 1973. Estudos sobre os afídeos vetores do Vírus do Nanismo Amarelo da Cevada, em especial de *Acyrtosiphon dirhodum*, em trigo no Sul do Brasil. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 104p.

Figuroa, C. C.; R. Loayza-Muro & H. M. Niemeyer. 2002. Temporal variation of RAPD-PCR phenotype composition of the grain aphid *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae) on wheat: role of hydroxamic acids. *Bulletin of Entomological Research* 92: 25-33.

Guillemaud, T.; L. Mieuze & J. C. Simon. 2003. Spatial and temporal genetic variability in French populations of the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Heredity* 91. 143-152.

Lewontin, R. C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology* 6: 381-398.

Llewellyn, K. S.; H. D. Loxdale; R. Harrington; C. P. Brookes; S. J. Clark & P. Sunnucks. 2003 Migration and genetic structure of the grain aphid (*Sitobion avenae*) in Britain related to climatic adaptation and clonal fluctuation revealed using microsatellites. *Molecular Ecology* 12, 21-34

Lopes-da-Silva, M.; G. E. L. Tonet & L. G. E. Vieira. Characterization and genetic relationships among Brazilian biotypes of *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphididae) using RAPD markers. *Neotropical Entomology* 33(1) 43-49

Lopes-da-Silva, M & M. M. Casagrande. 2003. Color polymorphism and allele frequency in a Brazilian population of the sunflower caterpillar *Chlosyne lacinia saundersi* (Doubleday) (Lepidoptera: Nymphalidae). *Neotropical Entomology* 32 (1): 159-161.

Lushai G.; O. Markovitch & H.D. Loxdale. 2002. Host-based genotype variation in insects revisited. *Bulletin of Entomological Research* 92: 159-64.

Martinez Torres D.; A. Moya.; P.D.N. Herbert & J. C.Simon. 1997. Geographic distribution and seasonal variation of mitochondrial DNA haplotypes in the aphid *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera : Aphididae). *Bulletin of Entomological Research*. 87: 161-167.

Massonet, B & W.W. Weisser. 2004. Patterns of genetic differentiation between populations of the specialized herbivore *Macrosiphoniella tanacetaria* (Homoptera, Aphididae). *Heredity* 93 (6): 577-584

Nicol, D.; K. F.Armstrong; S.D. Wratten; C.M. Cameron; C.M. Frampton & C.M. B. Fenton. 1997. Genetic variation in an introduced aphid pest (*Metopolophium dirhodum*) in New Zealand and relation to individuals from Europe. *Molecular Ecology* 6: 255-265.

Peters, D.C.; F. Ullah; M.A.Karner, W.B. Massey, P.G. Mulder & V.H. Beregovoy. 1997. Greenbug (Homoptera:Aphididae) biotype surveys in Oklahoma, 1991-1996. *Journal of the Kansas Entomological Society* 70: 120-128

Puterka, G.J. & D.C. Peters. 1990. Sexual reproduction and inheritance of virulence in the greenbug *Schizaphis graminum* (Rondani), p.289-317. Campbell, R.K. & R.D. Eikenbary (eds.). Aphid-plant genotype interactions, Amsterdam, Elsevier, 378p.

Shufran, K. A.; W. C. Black IV & D. C. Margolies. 1991. DNA fingerprinting to study spatial and temporal distributions of an aphid, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). Bulletin of Entomological Research 81: 303-313

Shufran, K.A.; D.C. Margolies & W.C. Black. 1992. Variation between biotype E clones of *Schizaphis graminum* (Homoptera:Aphididae). Bulletin of Entomological Research 82: 407-416.

Sunnucks, P.; P. J. De Barro; G. Lushai; N. Maclean & D. F. Hales. 1997. Genetic structure of an aphid studied using microsatellites: cyclic parthenogenesis, differentiated lineages, and host specialization. Molecular Ecology 6: 1059-1073.

Capítulo 4: Análise da Diversidade Genética de Linhagens Clonais de *Metopolophium dirhodum* Walker (Hemiptera: Aphididae) por marcadores RAPD

Capítulo 4: Análise da Diversidade Genética de Linhagens Clonais de *Metopolophium dirhodum* (Walker) (Hemiptera: Aphididae) por marcadores RAPD

Resumo

O pulgão *Metopolophium dirhodum* (Walker) (Hemiptera, Aphididae) tem grande importância econômica devido à capacidade de transmissão de vírus e danos infligidos aos

cereais pela sucção de seiva. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da distância geográfica e do hospedeiro sobre a diversidade genética de linhagens clonais de *M. dirhodum* usando marcadores RAPD. Vinte e três clones foram coletados em aveia e trigo em doze localidades do sul do Brasil. De vinte e sete iniciadores usados para a análise, quatro iniciadores demonstraram polimorfismos discerníveis e reproduzíveis. A análise de agrupamento por similaridade genética revelou haver catorze genótipos, cinco dos quais coletados exclusivamente em trigo, sete exclusivamente em aveia e dois em ambos hospedeiros. Não houve correlação entre as similaridades genéticas e a distância geográfica. A análise de variância molecular demonstrou que alguns marcadores RAPD não foram aleatoriamente distribuídos entre as linhagens clonais coletadas em aveia e em trigo. Estes resultados sugerem que a ocorrência de raças hospedeiro-especialistas em *M. dirhodum* no Brasil deve ser melhor investigada com a combinação de dados ecológicos e genéticos.

Palavras-chave: *Metopolophium dirhodum*, RAPD, diversidade genética, interação inseto-planta, raças hospedeiro-especialistas.

Chapter 4: Analysis of Genetic Diversity in *Metopolophium dirhodum* (Walker) (Hemiptera: Aphididae) by RAPD markers.

Abstract:

The aphid *Metopolophium dirhodum*, has great economical importance due to viruses transmission and damage inflicted by sap suction on cereals. The objective of this work was to assess the effects of hosts and geographic distance on genetic diversity of *M. dirhodum* clonal lineages using RAPD markers. Twenty-three clones were collected on oats and

wheat in twelve localities of Southern Brazil. From twenty-seven primers tested, only four primers discernible and reproducible polymorphisms. The cluster analysis revealed fourteen different genotypes. Five genotypes were collected exclusively on wheat; seven exclusively on oats and two were collected on both hosts. Genetic and geographical distances among all clonal lineages were not correlated. Analysis of Molecular Variance showed that some molecular markers are not randomly distributed among clonal lineages collected on oats and on wheat. These results suggested that the presence of host-races within *M. dirhodum* should be further investigated using a combination of ecological and genetic data.

Key words: *Metopolophium dirhodum*, RAPD, genetic diversity, insect-plant relationships, host-races

4.1 Introdução

4.1.1 Bionomia *M. dirhodum*

O gênero *Metopolophium* Mordvilko, 1914 compreende várias espécies, sendo que apenas *Metopolophium dirhodum* (Walker, 1849), *M. festucae* (Theobald, 1917), *M. cerealium* (Stroyan, 1982) e *M. alpinum* Hille Lis Lambers, 1966, apresentam importância econômica, principalmente *M. dirhodum*, por atacar cereais e ser vetor de vírus fitopatogênicos. Esta espécie era anteriormente incluída no gênero *Acyrtosiphon* (Blackman & Eastop 1984).

Nas regiões mais frias da Europa, a eclosão de ninfas de *M. dirhodum* ocorre na primavera em *Rosa* spp. (hospedeiro primário). Dessa forma, são geradas fêmeas ápteras, chamadas de fundadoras, que são partenogenéticas. Entre o fim da primavera e o início do verão, as fêmeas aladas originadas das fundadoras migram para os hospedeiros secundários (gramíneas), aonde irão se reproduzir por partenogênese (Halbert & Voegtlin 1995). No final do verão, ocorre a migração de volta para o hospedeiro primário, dando início à fase sexual do ciclo de vida com a produção de machos e fêmeas ovíparas. Esse acontecimento é desencadeado pelo encurtamento do fotoperíodo e diminuição da temperatura (Dixon 1985). Após a fecundação, as fêmeas colocam ovos que originarão as fundadoras, reiniciando o ciclo de vida anual.

As plantas hospedeiras listadas para *M. dirhodum* na Europa, América do Norte e América do Sul incluem trigo, aveia, cevada, centeio, milho, capim-cevadinha (*Bromus catharticus*), dátilo (*Dactylis glomerata*), grama-azul-do-kentucky (*Poa pratensis*) e falaris (*Phalaris* sp.) (Dean 1974, Nicol *et al.* 1997). Em certas partes da Europa, algumas populações de *M. dirhodum* apresentam holociclo monoécio, alternando a fase sexual e a assexual apenas em gramíneas, tal como *Schizaphis graminum* (Rondani) e *Sitobion avenae* (F.) (Prior 1976 *apud* Blackman & Eastop 1984).

M. dirhodum era raramente encontrado em trigo na Grã-Bretanha, mas a partir de uma grande infestação no final da década de 1970, houve uma modificação na importância econômica deste afídeo como praga naquele país (Vickerman & Wratten 1982). Este inseto tem grande importância em cereais na Alemanha, Polônia e Eslováquia, sendo que nesses dois últimos países é abundante em milho (Kot & Bilewicz-Pawinska 1989, Cagán 2001). *M. dirhodum* é a principal praga de trigo e outros cereais na Nova Zelândia (Nicol *et al.* 1997).

Na América do Sul foi constatado primeiramente no Brasil antes da década de 1970, e no Chile em 1972, e já foi considerado o principal pulgão praga do trigo nestes dois países (Zuñiga 1986, Salvadori 1999). Após um programa de controle biológico de forma inundativa empregando microhimenópteros parasitóides importados, *M. dirhodum* passou a ocasionar danos de forma esporádica (Salvadori & Tonet 2001).

O número de trabalhos versando sobre a genética de *M. dirhodum* é muito pequeno, se comparado com o número de trabalhos existentes com outras espécies de afídeos de importância econômica para os cereais.

De Barro *et al.* (1995) estudaram a diversidade genética de *M. dirhodum* e *S. avenae* em vários locais do Sul da Inglaterra em áreas de cultivos de trigo e nas áreas adjacentes. Foi observada a seleção de genótipos de afídeos pelo trigo apenas em *S. avenae*, na qual, a variabilidade genética encontrada em indivíduos nas áreas adjacentes foi maior que a encontrada no trigo, indicando a existência de um processo de seleção sobre os genótipos colonizadores em trigo. Independente da localidade, perfis genéticos das populações coletadas em trigo foram muito homogêneos, sugerindo uma estruturação genética com o hospedeiro. De modo diferente, *M. dirhodum* apresentou maior similaridade genética em função da procedência e não da espécie da planta hospedeira. A ausência de estruturação genética em *M. dirhodum* em relação ao hospedeiro é explicada pelos autores pela ocorrência bem mais frequente do ciclo sexual em *M. dirhodum* que em *S. avenae*. A recombinação pela reprodução sexual atenua o efeito da seleção disruptiva pelas plantas hospedeiras (De Barro *et al.* 1995).

Estudo conduzido na Nova Zelândia com marcadores RAPD apontou uma grande diversidade genética em *M. dirhodum*, não havendo, contudo, uma relação dessa variabilidade com a distribuição espacial (Nicol *et al.* 1997). A diversidade genética

encontrada na Nova Zelândia (onde a introdução é considerada recente) foi menor que a encontrada nas populações da Escócia. Os autores propõem a ocorrência de múltiplas introduções de diferentes clones da praga no país.

Estudos citogenéticos demonstram que as populações européias são $2n=18$ (Blackman & Eastop 1984). Entretanto, Rubin-de-Celis *et al.* (1997) encontraram dois cariótipos ($2n=16$ e $2n=18$) em clones de *M. dirhodum* coletados em Passo Fundo - RS. As implicações ecológicas da variação cariotípica na adaptação aos diferentes hospedeiros ainda não foram estabelecidas.

4.1.2 Defesas Químicas de Cereais e a Biologia dos Afídeos

O aparecimento de raças adaptadas em afídeos é principalmente devido às pressões seletivas ocasionadas pelos mecanismos de defesa das plantas (Gould 1978). Tendo em vista a base genética das adaptações ao hospedeiro, os indivíduos que compartilham um valor adaptativo semelhante, poderão ter, em consequência, maior similaridade genética. Conforme Caillaud *et al.* (1995) demonstrou para *S. avenae*, existe grande variação no desempenho de clones em relação a fontes de resistência em trigo. Assim, determinado clone (por conseguinte, determinado genótipo) pode se tornar muito associado a um hospedeiro particular em razão da sua melhor adaptação.

O principal mecanismo de defesa das plantas ao ataque de afídeos provém de compostos químicos (Niemeyer 1988). De forma geral, esses compostos químicos tem efeito de antibiose sobre os afídeos, o que é expresso pela diminuição da sobrevivência, da longevidade e da fecundidade (Panda & Kush 1995). Para superar as defesas da planta, o afídeo deve dispor de contra-adaptações que são manifestadas por meio de comportamentos alimentares particulares ou por metabolismo especial das substâncias químicas de defesa

(Givovich & Niemeyer 1997, Brattesten 1988). Os ácidos hidroxâmicos ou benzoaxinonas constituem as substâncias que promovem a resistência dos cereais aos afídeos de forma mais eficiente (Niemeyer 1988). Em níveis elevados, os ácidos hidroxâmicos provocam comportamento de deterrência nos afídeos *Rhopalosiphum padi* L., *S. avenae*., *M. dirhodum* e *S. graminum*, que levam um maior tempo para iniciar a alimentação (Givovich & Niemeyer 1997).

Nos cereais de inverno, os ácidos hidroxâmicos estão ausentes da aveia e presentes em níveis variáveis no trigo (Figueroa *et al.* 2002). Essas diferenças na composição de substâncias de defesa química podem ocasionar diferentes níveis de pressões seletivas. Em afídeos, a associação entre adaptação à defesa química de plantas e polimorfismos moleculares ainda não foi pesquisada de forma mais profunda (Figueroa *et al.* 2002).

4.2 Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a variabilidade genética de *Metopolophium dirhodum* no Brasil através do uso de marcadores moleculares RAPD e verificar se esta variabilidade genética está mais relacionada com o hospedeiro ou com a distribuição geográfica em *M. dirhodum*.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Obtenção e Multiplicação de Clones

As coletas de clones de *M. dirhodum* foram realizadas em áreas de lavouras de trigo, aveia-preta e branca, em 12 localidades dos estados do Paraná e do Rio Grande do

Sul (Tabela 4.1). Clones de mesma localidade e mesmo hospedeiro foram coletados em uma mesma área de lavoura. Foram obtidos 23 clones, que foram multiplicados sobre plântulas de trigo cv. IAC-5-Maringá plantadas em vasos mantidos em casa-de-vegetação.

4.3.2.Extração de DNA

O protocolo utilizado para a extração de DNA foi o de Carvalho & Vieira (2001). Cinco clones de cada linhagem foram acondicionados em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL para maceração com 60 μ L do tampão de extração (200 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 M NaCl, 0,5M EDTA) e 15 μ L de sarcosyl. As suspensões resultantes foram colocadas em uma placa aquecedora a 65°C por 30 min e após, centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi recolhido em um novo microtubo, onde foram adicionados 110 μ L de acetato de amônio e 250 μ L de isopropanol gelado para a precipitação do DNA. A seguir, os microtubos com os reagentes foram novamente centrifugados a 10.000 rpm durante 15 min e o sobrenadante descartado. O pellet de DNA foi submetido a duas lavagens com etanol 70 % e re-suspendido pela adição de 25 μ L tampão TE (Tris-EDTA, pH 8,0) contendo RNAase (10 μ g/mL) e guardado a -20 °C.

4.3.3 RAPD

As reações foram preparadas em microtubos de 0,6 mL no volume total de 25 μ L para cada reação contendo Tampão [20mM Tris HCl (pH 8,4), 50mM de KCl], 3mM de MgCl, 100 μ M de cada dNTP, 5 pmol de iniciadores, 1,0 U de *Taq* polimerase e aproximadamente 25 ng de DNA. As amplificações foram feitas utilizando-se o Termociclador PTC-100 (MJ Research) com seguinte programa de temperaturas: 5 min a

94°C seguidos de 40 ciclos de 1min a 94°C, 1 min 30s a 40°C e 3 minutos a 72°C, com extensão final de 5 min a 72°C. As amplificações foram analisadas em eletroforese a 5V/cm em gel de agarose (1,5%) e 0,5 X Tris-Borato-EDTA, sendo coradas em brometo de etídio a 0,5 µg/mL. Os géis foram visualizados e fotografados utilizando-se o sistema KODAK EDAS 120. Foram testados vinte iniciadores da série OPA (1-20), 4 da série OPB, 2 da OPG, 1 da OPH e 1 OPK

Tabela 4.1 Hospedeiros, locais, número de clones e códigos das linhagens clonais de *Metopolophium dirhodum*.

Hospedeiro	Local de Coleta	Número de clones	Código
Trigo	Londrina-PR	3	T-LON-1
			T-LON-2
			T-LON-3
	Ponta Grossa-PR	2	T-PG-1
			T-PG-2
	Tapera-RS	1	T-TAP-1
			T-IJ-1
	Ijuí-RS	2	T-IJ-2
			T-CAL-1
	Cruz Alta-RS	1	

Aveia-Preta	Campo Mourão-PR	1	A-CM-1	
	Ijuí-RS	1	A-IJ-1	
	Cruz Alta-RS		3	A-CAL-2
				A-CAL-3
				A-CAL-4
	Panambi-RS	3		
	Carazinho-RS	1	A-PAN-1	
Passo Fundo-RS	1	A-PAN-2		
Aveia -Branca	Não-Me-Toque-RS	2	A-PAN-3	
	Ibirubá-RS	1		
	Selbach-RS		1	A-CAR-1
				A-PFU-1
				A-NMT-1
				A-NMT-2
		A-IBI-1		
		A-SEL-1		

4.3.4 Análise dos dados

Apenas fragmentos menores que 2,5 kb e reproduzíveis em dois ou mais géis foram considerados para a análise. Utilizou-se o coeficiente de similaridade de Jaccard (Sneath & Sokal 1973) entre as linhagens clonais foram calculados da seguinte forma: $S_{1,2} = a/(a+b+c)$ onde: a = número de bandas presentes para ambas linhagens, b = número de bandas presentes para linhagem 1, mas não para a linhagem 2, c = número de bandas presentes para linhagem 2, mas não para a linhagem 1.

O método utilizado para a construção do dendrograma foi o UPGMA (Unweighted Paired Group with Arithmetic Mean) (Sneath & Sokal 1973).

Para testar da hipótese existência de um isolamento por distância, realizou-se um teste de associação entre as matrizes de dissimilaridade genética e de distância geográfica,

no qual o coeficiente de correlação matricial (r) é testado para significância na estatística de Mantel através de permutações dos valores de Z (Diniz-Filho 1998). Para evitar coeficientes de correlação com valor negativo, a matriz de dissimilaridade genética foi obtida através da fórmula $DS_{ab} = 1 - S_{ab}$, (DS_{ab} = índice de dissimilaridade entre a e b e S_{ab} = índice de similaridade entre a e b , oriundo da matriz de similaridade). O teste de associação das matrizes foi realizado de forma separada para as linhagens clonais coletadas em aveia e para linhagens clonais coletadas em trigo. Assim, obteve-se apenas o efeito da distância sobre a dissimilaridade genética, de forma independente da planta hospedeira de coleta.

A Análise Molecular da Variância (AMOVA) em dois níveis (populações clonais arrançadas em hospedeiros) foi realizada para investigar a influência da planta hospedeira sobre a variabilidade genética das linhagens clonais. Para esta análise empregou-se o programa AMOVA-PREP (Miller 1998) e WINMOVA versão 1.55 (Excoffier *et al.* 1992). Nesta análise, testou-se a hipótese de que valor do índice Φ_{st} (Excoffier *et al.* 1992) é estatisticamente diferente de zero, o que indicaria uma significativa diferenciação genética.

4.4 Resultados e Discussão

4.4.1 Variabilidade Genética

Dos 27 iniciadores testados, apenas quatro produziram polimorfismos: OPA-2, OPA-3, OPA-4 e OPA-7 (Figuras 4.1-4.4), cujo nível de polimorfismo está sumarizado na Tabela 4.2. Foi possível a distinção de 14 genótipos em 23 clones pesquisados. Com o iniciador OPA-4 encontrou-se um marcador muito associado às populações clonais coletadas nas aveias, sendo presente em 11 das 14 linhagens (Figura 4.3). Em trigo, este fragmento de 1.200pb observado foi presente apenas em uma das linhagens populações (Figura 4.4). Quanto à distribuição dos genótipos por hospedeiros, cinco foram exclusivos

de trigo, sete exclusivos das aveias e dois foram encontrados em ambos gêneros de planta (Figuras 4.5).

A variabilidade genética encontrada em *M. dirhodum* neste trabalho foi surpreendentemente alta para um afídeo-praga introduzido, embora semelhante aos níveis de variabilidade encontrada por Nicol *et al.* (1997) para esta espécie na Nova Zelândia. Os autores demonstraram ser possível distinguir 124 genótipos de 142 clones, com a utilização de gel de poliacrilamida na eletroforese dos fragmentos RAPD. Em gel de agarose, foi possível distinguir apenas cinco genótipos. Os autores encontraram um efeito significativo provocado pelo padrão temporal da amostragem, pois em um mesmo local, em diferentes épocas, há diferenças marcantes na composição genética dos afídeos.

É possível que a heterogeneidade quanto a época, localidade e planta hospedeira seja responsável pela alta diversidade observada em um pequeno número de clones analisados de *M. dirhodum*.

Tabela 4.2. Nível de polimorfismos encontrados com iniciadores de RAPD em 23 populações clonais de *Metopolophium dirhodum*.

Iniciador	Nº de marcadores RAPD reproduzíveis	de marcadores polimórficos	Número de marcadores polimórficos	Percentual de marcadores polimórficos
-----------	-------------------------------------	----------------------------	-----------------------------------	---------------------------------------

OPA-2	7	3	42,8 %
OPA-3	9	2	22,2 %
OPA-4	7	1	14,2 %
OPA-7	7	4	57,1 %
Total	30	10	33,3 %

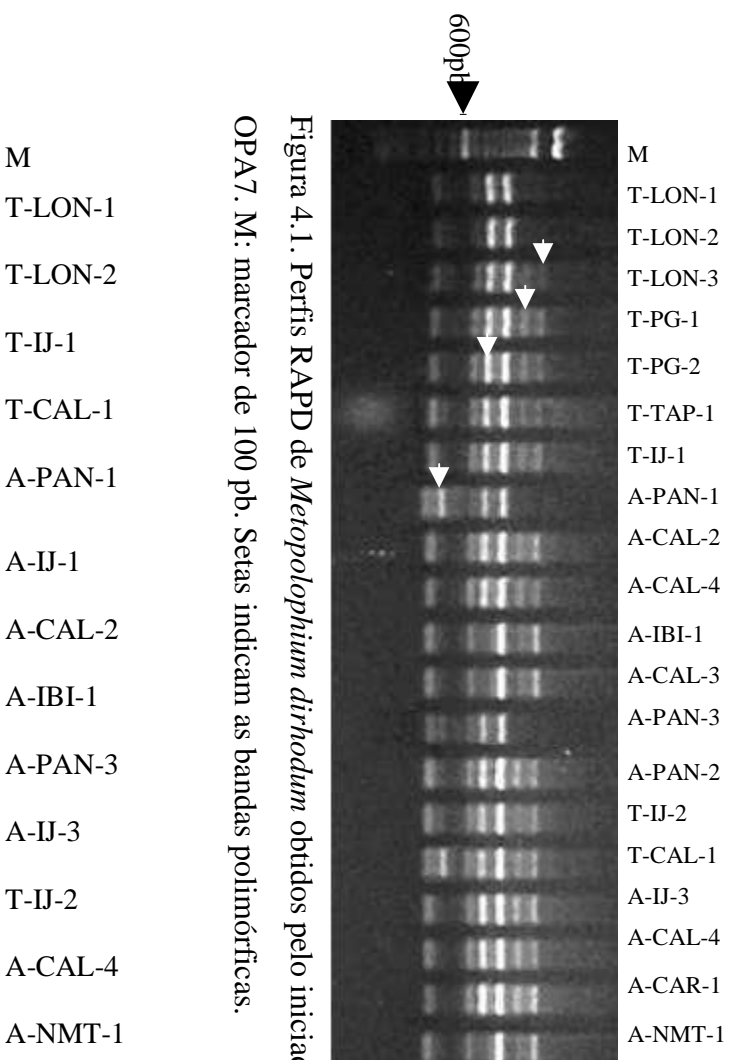


Figura 4.1. Perfis RAPD de *Metopophium dirhodum* obtidos pelo iniciador OPA7. M: marcador de 100 pb. Setas indicam as bandas polimórficas.

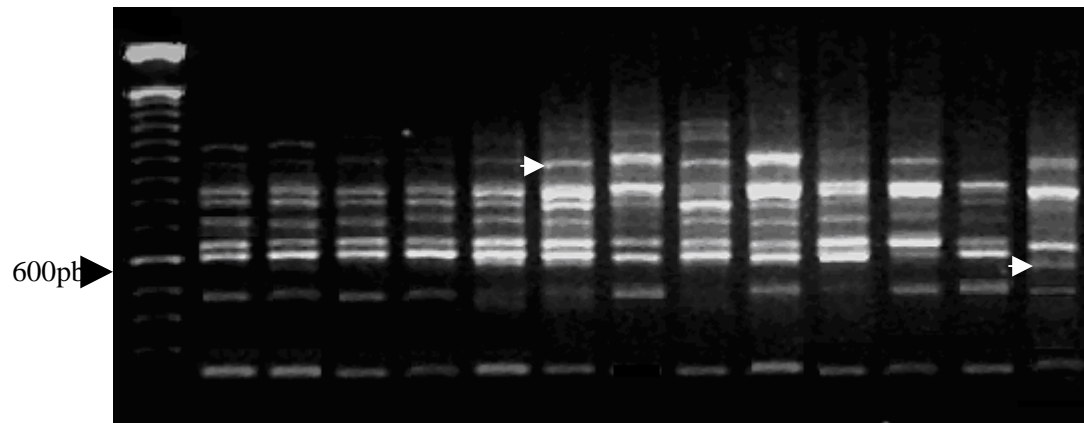


Figura 4.2 Perfis RAPD de *Metopophium dirhodum* obtidos pelo iniciador OPA3. M: marcador de 100pb. Setas indicam as bandas polimórficas

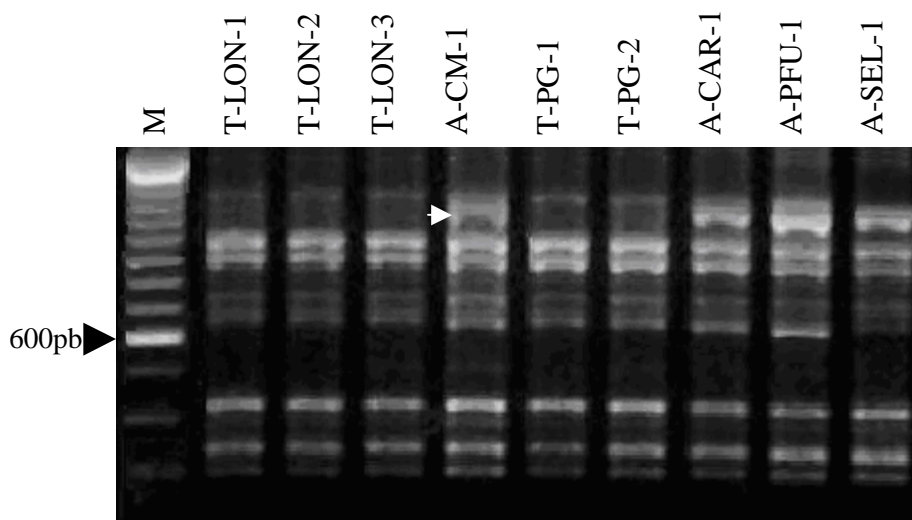


Figura 4.3. Perfis RAPD de *Metopophium dirhodum* obtidos com iniciador OPA4. M :marcador 100 pb. Seta branca mostra a banda de 1200 pb.

M
T-LON-1
T-LON-2
T-LON-3
T-PG-1
T-PG-2
T-TAP-1
T-II-1
T-II-2
T-CAL-1
A-PAN-1
A-PAN-2
A-CAL-2
A-CAL-3
A-IBI-1
A-II-3
A-CAL-4
A-CM-1
A-CAR-1
A-NMT-1

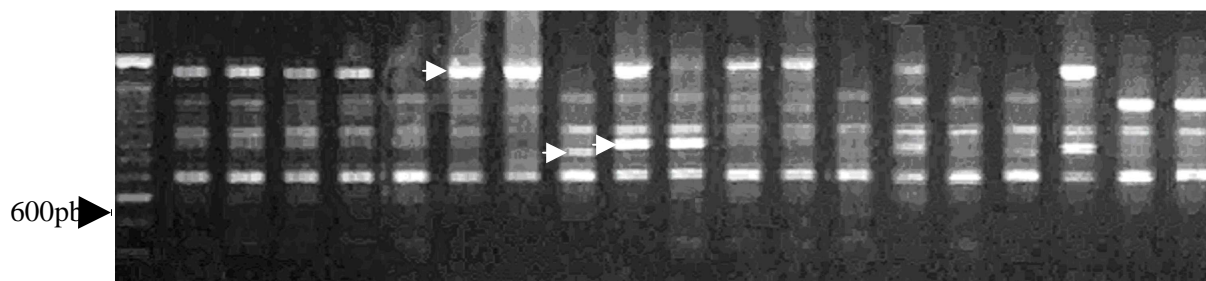


Figura 4.4 Perfis RAPD de *Metopolophium dirhodum* obtidos com iniciador OPA2.
M: marcador de 100 pb. Setas brancas assinalam bandas polimórficas.

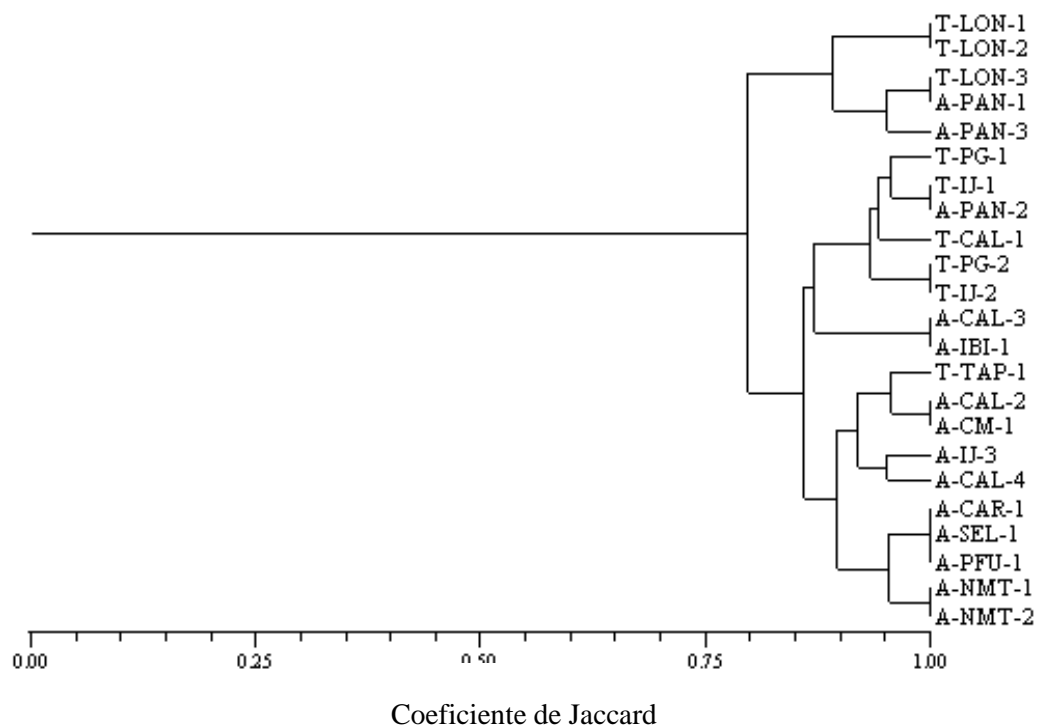


Figura 4.5. Dendrograma das relações genéticas entre as linhagens clonais de *Metopolophium dirhodum* (valor 1,00 no coeficiente significa 100 % de similaridade).

4.4.2 Correlação entre Dissimilaridade Genética e Distância Geográfica

A correlação entre a distância geográfica e a dissimilaridade genética não foi significativa tanto para as linhagens clonais coletadas em trigo ($r = 0,27$, $p = 0,08$) como para as linhagens coletadas em aveia ($r = -0,17$, $p = 0,13$) (Figuras 4.6 e 4.7). Estes resultados indicam os marcadores encontrados não se associam com uma possível adaptação às condições ambientais em uma escala espacial de dezenas de quilômetros.

O isolamento genético por distância é um fenômeno raro em afídeos quando se trata de áreas geográficas contíguas. Apenas De Barro *et al.* (1995) encontrou estruturação microgeográfica em *M. dirhodum* no sul da Inglaterra. Neste caso, isto se deve a existência de ciclo sexual, com maior probabilidade de ocorrência de acasalamento entre indivíduos mais próximos. Em locais em que se constata a ausência da fase sexual, a diversidade genética pode não estar correlacionada com a distância geográfica. Nicol *et al.* (1997) apontam ausência de estruturação genética em escala microgeográfica (distâncias < 1 km)

em *M. dirhodum* na Nova Zelândia, país em que as populações deste pulgão são exclusivamente anolocíclicas, tal como no Brasil (De Barro *et al.* 1995).

Segundo Salvadori & Tonet (2001), *M. dirhodum* predomina nas regiões meridionais, especialmente em épocas de primaveras amenas e pouco chuvosas. É possível que esta espécie tenha limitada distribuição geográfica em função da não adaptação à temperaturas elevadas do centro do País, situação que favoreceria que a migração no Brasil ficasse restrita a região Sul.

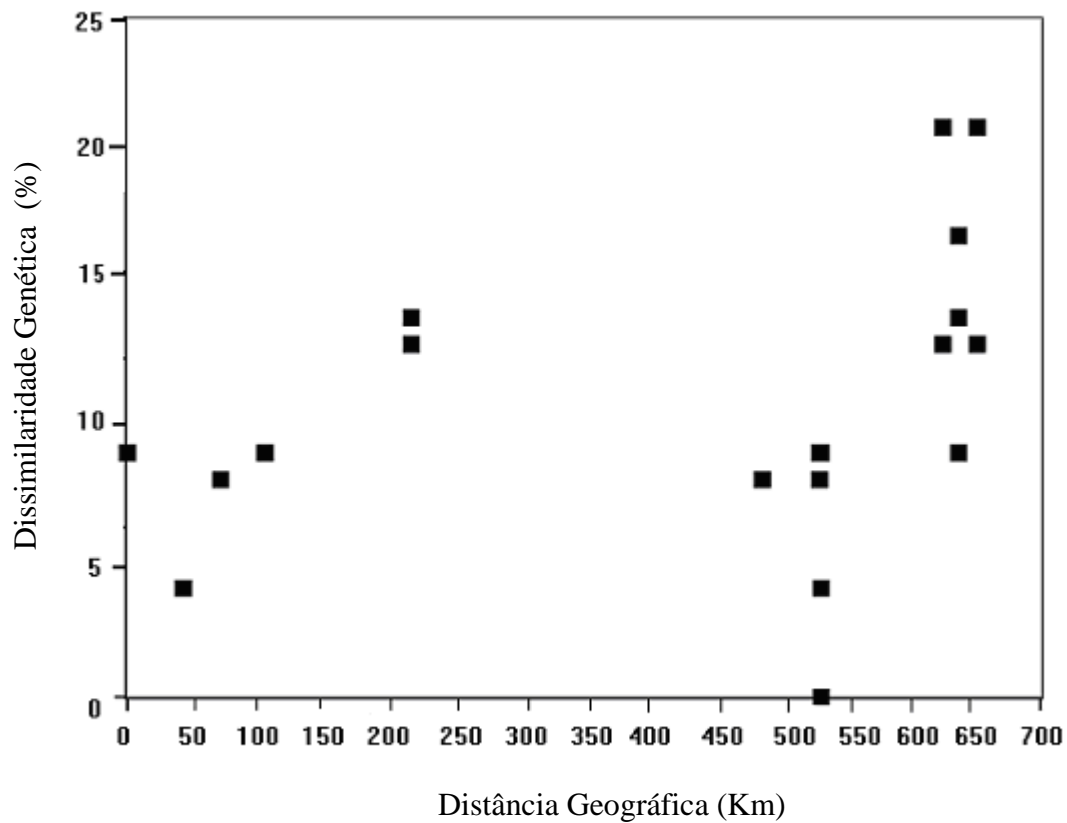


Figura 4.6. Associação entre Dissimilaridade Genética e Distância Geográfica em linhagens clonais de *Metopolophium dirhodum* coletadas em trigo ($r= 0,27$ $p= 0,08$)

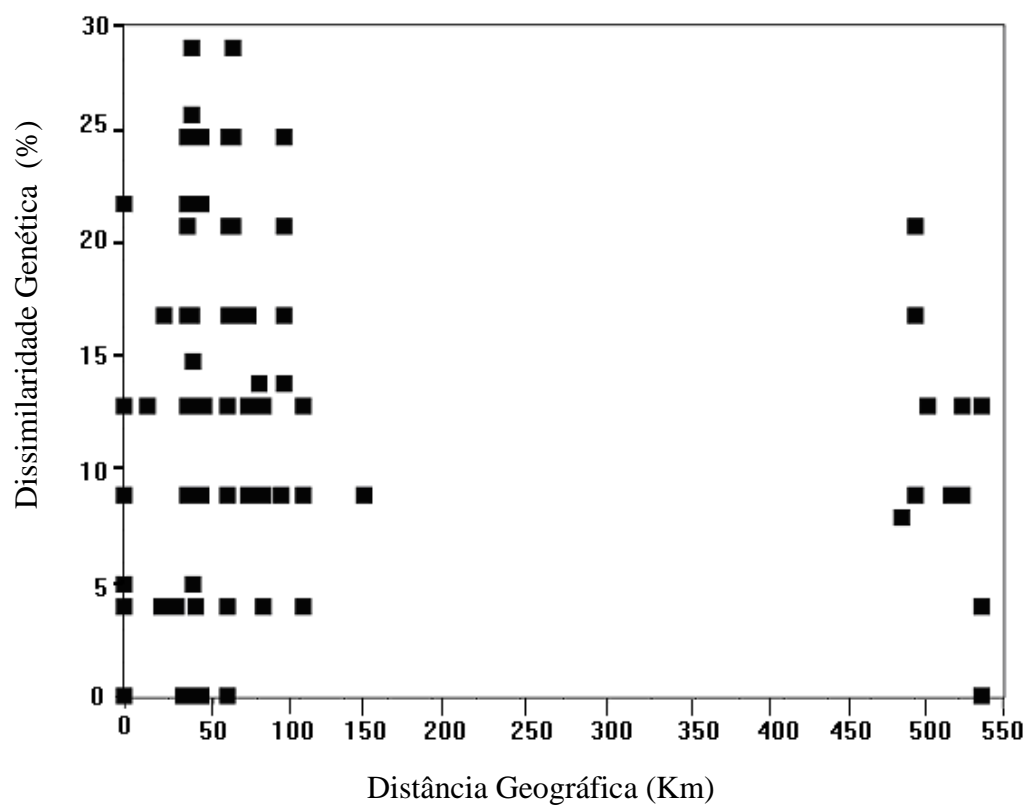


Figura.4.7. Associação entre Dissimilaridade Genética e Distância Geográfica ente as populações clonais de *Metopolophium dirhodum* coletadas em aveia ($r = -0,17$ $p = 0,13$).

4.4.3 Análise da Variância Molecular (AMOVA)

A AMOVA indicou diferença significativa na distribuição do polimorfismo RAPD entre as linhagens coletadas em trigo e em aveia ($\Phi_{st} = 0,21$ $p < 0,01$). Isto demonstra que o polimorfismo do RAPD não se distribuiu aleatoriamente entre os dois hospedeiros. A possibilidade de que determinados genótipos de *M. dirhodum* distintos por RAPD sejam mais associados a um determinado hospedeiro encontra respaldo nas observações de Lushai *et al.* (2002). Nesse trabalho, os autores demonstraram que certos genótipos de *Sitobion avenae* distintos por RAPD são encontrados exclusivamente sob um hospedeiro, mesmo em um local onde potencialmente todas as espécies de plantas serviriam para sua alimentação. Nessa espécie, distingue-se a existência de raças hospedeiro-especialistas em trigo (*Triticum aestivum*) e outra em dátilo (*D. glomerata*), por meio de diferenças de adaptação na nessas duas plantas hospedeiras (De Barro *et al.* 1995).

Para indicar com exatidão a existência de uma raça hospedeiro-especialista é necessário demonstrar a existência de diferenças de adaptação em relação às plantas hospedeiras. No caso de *M. dirhodum*, essa informação poderia ser obtida por meio de experimentos recíprocos, nos quais as populações distintas são criadas nas duas espécies hospedeiras (trigo e aveia). Como os ácidos hidroxâmicos reduzem a fertilidade e a sobrevivência de *M. dirhodum* (Cambier *et al.* 2001), seria importante investigar se a presença ou a ausência desses compostos poderia ter papel na seleção de linhagens clonais adaptadas.

Diferenças de cariótipo entre clones de *M. dirhodum* também devem ser consideradas do ponto de vista da adaptação à planta hospedeira. Em afídeos, já foi relatada a associação entre cariótipos e preferência hospedeira (Blackman *et al.* 1990). Também é necessário primeiramente avaliar se há divergência evolutiva importante entre dois grupos de linhagens clonais caracterizados pelo polimorfismo RAPD/planta hospedeira de coleta.

4.5 Conclusões

- A diversidade genética de *M. dirhodum* observada em clones coletados no sul do Brasil é relativamente alta para uma espécie de afídeo introduzido e que se reproduz por partenogênese.
- A distância geográfica entre linhagens clonais de *M. dirhodum* não se correlaciona com a similaridade genética.
- Há uma significativa diferença genética entre as linhagens clonais de *M. dirhodum* coletadas em trigo e as coletadas e nas aveias.

Literatura Citada:

Blackman, R. L. & V. F. Eastop. 1984. Aphids on the World's Crops: Identification and Information Guide. John Wiley Sons. 476p.

Blackman, R. L.; Halbert, S. & Carrol, T. W. 1990. Association between karyotype and host plant in corn leaf aphid (Homoptera: Aphididae) in northwestern United States. *Environmental Entomology* 19: 609-611

Cagán, L. 2001. Relation between aphid and ladybird populations in the maize field. *Acta phytotechnica et zootechnica* 2001, Special Number Proceedings of the International Scientific Conference on the Occasion of the 55th Anniversary of the Slovak Agricultural University in Nitra. 4: 310-311.

Caillaud, C.M., C.A. Dedryver, J.P. Di Pietro, F. Fima, J.C. Simon & B. Chaubet. 1995. Clonal variability in the response of *Sitobion avenae* (Homoptera:Aphididae) to resistant *Triticum monococcum* wheat lines. *Bulletin of Entomological Research* 85, 189-195

Cambier, V.; Hance, T. & Hoffmann, E. 2001. Effects of 1,4-benzoxazin-3-one derivatives from maize on survival and fecundity of *Metopolophium dirhodum* (Walker) on artificial diet. *Journal of Chemical Ecology* 27: 359-370

Carvalho, A. O. R. & L. G.E. Vieira. 2001. Determinação das condições ótimas para análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera:Formicidae). *Neotropical Entomology* 30: 593-600

De Barro, P., T. N. Sherrat G.R. Carvalho, D. Nicol, A. Yengar & N. McClean. 1995. The use of multilocus (GATA)₄ probe to investigate geographic and microgeographic genetic structure variation in two aphid species over Southern England. *Molecular Ecology* 4: 375-382

Dean, G.J.W. 1974. The overwintering and abundance cereal aphids. *Annals of Applied Biology* 76: 1-7

Halbert, S. & D. Voegtlin. 1995. Biology and taxonomy of vectors. In: D'Arcy, C & P.A. Burnett. *Barley Yellow Dwarf 40 years of Progress*. American Phytopatological Society Press. 217-257.

Diniz-Filho, A. J.1998. Análise de autocorrelação espacial: inferências microevolutivas e aplicações em genética de populações. *Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. Série Monografias* 6:82-145.

Dixon, A.F.G. 1985. Structure of aphid populations. *Annual Review of Entomology* 30:155-174.

Drés, M & J. Mallet. 2002. Host races in plant feeding insects and their importance in sympatric speciation. *Phylosophy Transactions of Royal Society of London B* 357(1420): 471-92.

Excoffier, L.; P. E. Smouse & J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

Figueroa, C. C.; R. Loayza-Muro & H.M. Niemeyer. 2002. Temporal variation of RAPD-PCR phenotype composition of the grain aphid *Sitobion avenae* (Hemiptera:Aphididae) on wheat: role of hydroxamic acids. *Bulletin of Entomological Research* 92: 25-33.

Gianoli, E.; C. M. Caillaud, B. Chaubet, J.P. Di Pietro & H. M. Niemeyer.1997.Variability in grain aphid (Homoptera: Aphididae) performance and aphid-induced phytochemical Responses in Wheat. *Environmental Entomology* 26: 638-641.

Givovich, A. & H. M. Niemeyer. 1995. Comparison of the effect of hydroxamic acids from wheat on five species of cereal aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 74:115-119.

Givovich, A & H.M. Niemeyer.1997. Effect of hydroxamic acids on feeding behaviour and performance of cereal aphids (Hemiptera: Aphididae) on wheat. *European Journal of Entomology*. 91: 371-374

Gould, F. 1978. Predicting the future resistance of crop varieties to pest populations: a case study of mites and cucumbers. *Environmental Entomology* 7: 622-626

Kot, J. & Bilewicz-Pawinska. 1989. Preliminary investigation of the maize entomofauna in the Warsaw region. *Acta Phytopathologica Entomologica Hungarica* 24:141-144.

Lopes-da-Silva, M; G. E. L. Tonet & L.G.E.Vieira. 2004. Characterization and genetic relationships among Brazilian biotypes of *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphididae) using RAPD markers. *Neotropical Entomology* 33: 43-49.

Loxdale, H. 1990. Estimating levels of genetic flow between natural populations of cereal aphids (Hemiptera: Aphididae) *Bulletin of Entomological Research* 80: 331-338.

Loxdale, H.D & G. Lushai. 2003. Intraclonal and genetic variation: ecological and evolutionary aspects. *Biological Journal of Linnean Society* 79: 3-16.

Lushai, G.; O. Markovitch & H.D. Loxdale. 2002 Host-based genotype variation in insect revisited. *Bulletin of Entomological Research*. 92:159-164

Loxdale , H. 1990. Estimating levels of genetic flow between natural populations of cereal aphids (Hemiptera: Aphididae) *Bulletin of Entomological Research* 80: 331-338

Miller, M. P. 1998. AMOVA-PREP freeware version 1.01 in mpm@nauvaux.ucc.nau.edu

Nicol, D.; K. F. Armstrong, S.D. Wratten; C. M. Cameron; C. Frampton & B. Fenton. 1997. Genetic variation in an introduced aphid pest (*Metopolophium dirhodum*) in New Zealand and relation to individuals from Europe. *Molecular Ecology* 6: 255-265.

Niemeyer, H.M. 1988. Hydroxamic acids (4-Hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defense chemicals in the Gramineae. *Phytochemistry* 27:3349-3358.

Panda, N. & G.S. Kush. 1995. *Host Plant Resistance to Insects*. CABI. 431 p.

Rohlf F. J. 1998. *NTSYSpc: Numerical Taxonomy System*, ver. 2.0. Exeter publishing, Ltd.: Setauket, NY.

Rubin-de-Celins, V.; D.N. Gassen, M.C. Santos-Colares, A.K. Oliveira & V.L.S.Valente. 1997. Chromosome studies in southern Brazilian wheat pest aphids *Sitobion avenae*, *Schizaphis graminum*, *Methopolophium dirhodum* (Homoptera:Aphididae). *Brazilian Journal of Genetics* 20: 415-419

Salvadori, J. & G. E. L.Tonet. 2001. *Manejo integrado dos pulgões do trigo*. EMBRAPA. Passo Fundo, 52 p.

Salvadori, J.R.1999. Controle biológico de pulgões de trigo: o sucesso que perdura. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999. 2p.html. (Embrapa Trigo. Comunicado Técnico Online, 27). Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co27.htm

Shufran, K.A; Margolies, D.C. & Black, W.C. IV.1992.Variation between biotype E clones of *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). Bulletin of Entomological Research, 82: 407-416.

Sneath, P. H. A. & R. R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy: the principle and practice of numerical classification. V. H. Freeman, 537 p.

Vickerman, G.P & S.D. Wratten, S.D. 1979. The biology and status of cereal aphids (Hemiptera: Aphididae) in Europe: a review. Bulletin of Entomological Research 69:1-32.

Zuñiga, E. 1986. Control biológico de los afidos de los cereales en Chile. I. Revisión histórica y líneas de trabajo. Agricultura Tecnica 46: 475-477.

**Capítulo 5: Variação no Segundo Espaçador Interno
Transcrito (ITS2) do DNA Ribossomal em Linhagens**

Clonais de *Metopolophium dirhodum* (Walker) (Hemiptera: Aphididae)

Capítulo 5: Variação no Segundo Espaçador Interno Transcrito do DNA Ribossomal (ITS2) em Linhagens Clonais de *Metopolophium dirhodum* (Walker) (Hemiptera: Aphididae)

Resumo

A seqüência de nucleotídeos do segundo espaçador interno transcrito do DNA ribossomal (ITS2) tem sido muito utilizada em estudos taxonômicos e genético-populacionais. O objetivo deste trabalho foi verificar a existência de uma divergência evolutiva em função da planta hospedeira entre as linhagens clonais de *M. dirhodum* caracterizadas por RAPD, utilizando seqüência parcial de nucleotídeos do ITS2. DNA foi extraído de cinco linhagens clonais diferentes derivadas de fêmeas partenogênicas e a região ITS foi amplificada por PCR usando-se iniciadores específicos, sendo o produto de PCR clonado e, posteriormente, seqüenciado. Das 25 seqüências obtidas, 17 foram usadas para a análise. Dentre as 250 posições originadas pelo alinhamento múltiplo com a região homóloga de *Acyrtosiphon pisum*, 10,4% foram variáveis, com a predominância de indels sobre substituições. A média

da diversidade de nucleotídeos (π) dentro das linhagens clonais foi similar à diversidade entre as linhagens clonais. A topologia inferida por *Neighbor Joining* mostrou não haver divergência da região ITS2 das linhagens clonais caracterizadas por RAPD que pudesse ser associada à planta hospedeira. As variações de ITS2 dentro das linhagens clonais e suas causas são discutidas.

Palavras-Chave: ITS2, afídeos, linhagens clonais, evolução molecular.

Chapter 5: Variation in the Second Internal Transcribed Spacer (ITS2) of Ribosomal DNA within Clonal Lineages of *Metopolophium dirhodum* (Walker) (Hemiptera: Aphididae).

Abstract

The nucleotide sequence of the ribosomal DNA Second Internal Transcribed Spacer (ITS2) has been used in taxonomic and genetic studies. The aim of this work was to investigate the existence of evolutionary divergence caused by host plant among clonal lineages of *M. dirhodum* characterized by RAPD using partial ITS2 nucleotide sequences. The DNA was extracted from five clonal lineages of parthenogenetic female and the ITS region was amplified by PCR, cloned and sequenced. From 25 sequences, only 17 were used due to their quality for analysis. Within 250 nucleotide sites originated by multiple alignments with *Acyrtosiphon pisum* homologous ITS2 region, 10.4% were variable, with predominance of indels over substitutions. The average of nucleotide diversity (π) within clonal lineages was similar to the diversity among clonal lineages. The topology inferred by the Neighbor Joining showed that there is no evolutionary divergence among clonal

lineages characterized by RAPD that could be associated with host-plant. The ITS2 variations found within clonal lineages and their causes are discussed.

.Key words: ITS2, aphid, clonal lineages, molecular evolution.

5.1 Introdução

5.1.1 Caracterização da estrutura do DNA Ribossomal

O DNA ribossomal eucariótico (rDNA) está arranjado em unidades repetidas, cada qual contendo os genes de RNAs ribossomais 18S, 5.8 S e 28S. Estes genes são separados por espaçadores: os espaçadores intergênicos (*IGS-Intergenic Transcribed Spacers*), os espaçadores transcritos externos (*ETS-External Transcribed Spacers*) e os espaçadores transcritos internos (*ITS-Internal Transcribed Spacers*) (Figura 5.1). Os IGS separam as diferentes unidades repetidas e os ITS situam-se entre o 18S e 28S. Os ITS são divididos em ITS1, localizados entre o 18S e o 5.8S, e os ITS2, que separam os genes 5.8S e 28S (Hillis & Dixon 1991, Schlotterer *et al.* 1994).

A alta homogeneidade da seqüência dos nucleotídeos entre as cópias do DNA ribossomal é mantida dentro dos indivíduos e mesmo dentro da espécie pelo fenômeno da evolução em concerto. Os principais mecanismos apontados como responsáveis pela evolução em concerto são a recombinação desigual e a conversão gênica (Dover 1982). Enquanto as regiões dos genes ribossomais são altamente conservadas dentro da espécie, as

regiões dos espaçadores ITS podem variar intraespecificamente na seqüência de bases e no comprimento, aparentando não estarem sob a mesma intensidade de seleção (Gerbi 1985).

Nos genes ribossomais, a taxa total de substituição (trocas de nucleotídeos através do tempo) é muito lenta. Assim, esses genes podem servir para estudo de filogenia de táxons com categoria superior a gênero (tribos, superfamílias, ordens). Segundo Moran *et al.* (1993) as taxas de divergência entre seqüências de genes ribossomais que partilham um mesmo ancestral a 100 milhões de anos estão em torno de 2-4%.

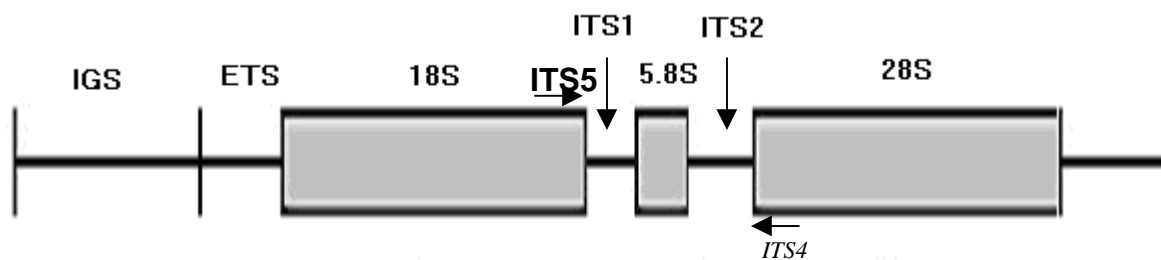


Figura 5.1. Esquema do cistron do DNA ribossomal mais comumente encontrado em eucariotos. A região contida entre os iniciadores ITS4 e ITS5 corresponde ao fragmento amplificado para o sequenciamento. ITS1, primeiro espaçador transcrito interno; ITS2, segundo espaçador transcrito interno; IGS, espaçador intergênico; ETS, espaçador transcrito externo; 18S, gene do RNA ribossomal 18S; 5.8S, gene para o RNA ribossomal 5.8S; 28S, gene para o RNA ribossomal 28S.

Dentre os espaçadores, o IGS é o que evolui mais rapidamente, servindo para estudos populacionais ou até mesmo “fingerprinting” de indivíduos. Os ETS apresentam a taxa mais lenta de evolução, muito provavelmente em função de seu papel de sinalizador para transcrição dos RNAs ribossomais. Os ETS raramente foram utilizados para inferir filogenias, pois há dificuldade na construção de iniciadores em função da raridade de regiões conservadas no IGS (Hillis & Dixon 1991).

Os espaçadores do rDNA mais versáteis no fornecimento de informação para filogenias entre espécies são os espaçadores transcritos internos ITS1 e ITS2. O ITS1 e o ITS2 evoluem muito mais rapidamente que os genes ribossomais e bem mais lentamente que o IGS. Além disso, a amplificação dos dois ITS via PCR é facilitada pelas regiões flaqueadoras altamente conservadas nos genes 18S, 5.8S e 28S, o que permite a construção de iniciadores universais (Hillis & Dixon 1991).

As regiões ITS têm sido também usadas como relógios moleculares para estimar tempo de divergência entre dois táxons. Por exemplo, a taxa de substituição de bases do ITS2 observada para a maioria dos organismos é de 0,3 a 0,8% por um milhão (Bargues *et*

al. 2000). Em Triatominae (Hemíptera: Reduviidae) foi determinada uma taxa de 1% por milhão de anos (Bargues *et al.* 2000).

Tanto o ITS1 quanto o ITS2 são freqüentemente utilizados para a taxonomia de espécies e gêneros (Schlotterer *et al.* 1994). Usualmente a seqüência de nucleotídeos destes espaçadores evolui em concerto dentro de populações de cruzamentos abertos (Liao 1999) e populações geograficamente definidas (Vogler & DeSalle 1994). Contudo, deve haver uma certa cautela nos estudos para caracterizar populações pela seqüência das regiões ITS devido à variação intraindividual recentemente encontrada em ITS1 e ITS2 (Harris & Crandall 2000). Leo & Baker (2002) observaram mais de uma seqüência diferente de ITS2 em um indivíduo da espécie de piolho humano (*Pediculus humanus* (Anoplura: Pediculidae). No caso de ácaros ixodídeos, várias cópias de seqüências diferentes foram encontradas em um mesmo indivíduo, tornando inviável a utilização de seqüências de ITS para estudos populacionais (McLain *et al.* 1995)).

Este tipo de heterogeneidade de seqüências é esperado em linhagens assexuais, nas quais a evolução em concerto poderia ser impedida ou diminuída por ausência de recombinação (Fuertes-Aguilar *et al.* 1999) como é o caso de *Metopolophium dirhodum* (Walker) no Brasil. Após uma longa série de gerações apomíticas, diferenças na seqüência nucleotídica entre alelos podem ser adquiridas (Birky 1996). Neste caso, se a evolução em concerto é menos eficiente na homogeneização da seqüência nucleotídica da região ITS, uma certa variação poderia ser encontrada entre as múltiplas cópias dos genes dentro de indivíduos (Gandolfi *et al.* 2001). Por exemplo, a maior parte da variação na seqüência de ITS1 (80% do total) em *Darwinula stevensoni* (Crustacea), um organismo assexual, foi encontrada dentro de indivíduos (Gandolfi *et al.* 2001).

O trabalho de Fenton *et al.* (1998) relata a ocorrência de variação intragenômica na seqüência de ITS1 no afídeo *Myzus persicae* (Sulzer), constatando-se a existência de dois haplótipos dentro de um mesmo indivíduo.

Black (1993) afirma que as espécies de insetos que ciclicamente alternam fase sexual e assexual fornecem excelente oportunidade para estudar as mudanças que seguem nas famílias de multigenes, após um período de isolamento. Esse é o caso específico dos afídeos, os quais também apresentam indivíduos obrigatoriamente assexuais.

5.2 Objetivo

O objetivo deste trabalho foi o de verificar a existência de uma divergência evolutiva associada à planta hospedeira entre as linhagens clonais de *M. dirhodum* previamente caracterizada por RAPD, utilizando-se o seqüenciamento da região ITS2 do rDNA.

5.3 Material e Métodos

5.3.1 Seleção das Populações Clonais do Afídeo.

As linhagens clonais utilizadas no presente trabalho foram selecionadas com base nos resultados do trabalho de caracterização de linhagens clonais de *M. dirhodum* por RAPD, que evidenciou polimorfismo de DNA com uma associação putativa à planta hospedeira (Capítulo 4). Além destas, uma linhagem clonal de *M. dirhodum* obtida junto ao CIMMYT (El Batán – México) e coletada em trigo (J. Lage, informação pessoal), foi utilizada no presente trabalho (Tabela 5.1).

5.3.2 Extração do DNA

O protocolo utilizado para a extração de DNA genômico foi o de Carvalho & Vieira (2001). Cinco clones de cada linhagem oriundos de uma fêmea partenogenética foram acondicionados em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL para maceração com 200µL do tampão de extração (200 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 M NaCl; 0,5M EDTA) e 50 µL de sarcosyl. As suspensões resultantes foram colocadas em uma placa aquecedora (65°C) por 30 min e centrifugadas a 10000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi recolhido em um novo microtubo, onde foram adicionados 110 µL de acetato de amônio e 250 µL de isopropanol gelado para a precipitação do DNA. Essa solução foi guardada no congelador a -20°C por 8h. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 10000 rpm durante 15 min e o sobrenadante descartado. O “pellet” de DNA foi submetido a duas lavagens com etanol 70% e re-suspendido pela adição de 25µL de tampão TE (Tris-EDTA, pH 8,0) contendo RNAase (10µg/mL) e guardado a -20 °C.

5.3.3 Reações de PCR para Amplificação da Região ITS

As reações de PCR foram conduzidas em tubo de microcentrífuga de 0,6 mL em volume total de 50 µL, contendo 100µM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 2,5µM dos iniciadores ITS-4 (18S) 5'-TCCTCCGCTTTATTGATATGC-3' e ITS-5 (gene 28S) 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' (White *et al.* 1991), 1,25 U de *Taq* polimerase e tampão (10mM Tris-HCl, 3mM MgCl₂, 50mM de KCl, pH 8.3). As amplificações foram realizadas no termociclador PTC-100TM (MJ Research, Inc.) utilizando o seguinte

programa: 3 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 1min a 95°C, 1 min a 55°C e 2 min a 72°C, com extensão final de 5min a 72°C.

5.3.4 Clonagem e Seqüenciamento

O fragmento contendo a região de interesse foi isolado do gel, pelo método “freeze-thaw” e recolhido em microtubo de 1,5 mL. Para a remoção das impurezas, adicionou-se acetato de sódio 3M (pH 5,2) na quantidade de 10% do volume. Em seguida adicionou-se 2x volume de etanol a 100%, sendo a suspensão mantida durante 30min a 0°C. Após centrifugação de 10000 rpm por 5 min, os precipitados foram lavados com 200 µL de etanol a 70% e secados à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspenso em 10 µL de TE + RNase.

O fragmento foi clonado por meio do Kit Topo TA (Invitrogen), conforme especificações do fabricante, e transformado em *Escherichia coli* estirpe DH5-α por eletroporação. Após o crescimento dos clones bacterianos, parte do meio contendo as bactérias transformadas foi plaqueado em placas de Petri contendo 20 mL de meio LB sólido, 100 µL de Ampicilina, X-gal e IPTG. As colônias foram deixadas para crescer por 12 h a 37°C. Foram selecionadas cinco colônias por placa para representar o fragmento amplificado dos espaçadores do rDNA de cada linhagem clonal do afídeo. O DNA plasmidial foi extraído por meio de lise alcalina (Sambrook *et al.* 1990). O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador MegaBace 1000, utilizando-se o iniciador reverso M13 (5'-AGGAAACAGCTATGAC-3').

Tabela 5. 1. Linhagem clonal, número e código da seqüência analisada por linhagem clonal, locais de coleta e planta hospedeira de *M. dirhdoum*

Linhagem clonal	Número de seqüências analisadas	Código da seqüência	Local de coleta	Planta hospedeira
T-CAL-1	2	T-CAL-1-A T-CAL-1-B	Cruz Alta, RS, Brasil	Trigo Trigo
T-IJ-2	3	T-IJ-2-A T-IJ-2-B T-IJ-2-C	Ijuí,RS, Brasil	Trigo Trigo Trigo

T-MEX-1	5	T-MEX-1-A T-MEX-1-B T-MEX-1-C T-MEX-1-D T-MEX-1-E	El Batan, México	Trigo Trigo Trigo Trigo Trigo
A-PAN-3	4	A-PAN-3-A A-PAN-3-B A-PAN-3-C A-PAN-3-D	Panambi,RS, Brasil	Aveia-preta Aveia-preta Aveia-preta Aveia-preta
A-SEL-1	3	A-SEL-1-A A-SEL-1-B A-SEL-1-C	Selbach, RS, Brasil	Aveia-branca Aveia-branca Aveia-branca

5.3.5 Análise dos Dados

O alinhamento das seqüências foi realizado através do programa Clustal-W, penalizando a abertura de deleções em 5 e a extensão da deleção em 2. A retificação manual do alinhamento foi realizada no programa Bioedit (Hall 1997, www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html).

A diversidade de nucleotídeos (π) foi calculada conforme Nei & Li (1979):

$$\pi = \Pi/L$$

onde Π = média de diferenças de nucleotídeos entre duas seqüências aleatoriamente escolhidas na população e L = tamanho da seqüência (número de bases). Com “n” seqüências tomadas ao acaso na população, Π é calculado através da fórmula:

$$\Pi = 1/[n(n-1)/2] \cdot \sum_{i < j} \Pi_{ij}$$

onde Π_{ij} é o número de diferenças entre as seqüências “i” e “j”, sendo $n(n-1)/2$ o número de pares possíveis (Li 1997). A diversidade de nucleotídeos foi calculada entre seqüências de mesma linhagem clonal e entre seqüências de diferentes linhagens clonais. Considerou-se a deleção obtida no alinhamento entre duas seqüências como quinta base.

Na análise das seqüências utilizou-se o software MEGA (Molecular Evolution Genetic Analysis) versão 2.1 (Kumar *et al.* 2001). Para a reconstrução filogenética, foi utilizado o método de distância Neighbor Joining (NJ) (Saitou & Nei 1987). A distância entre pares de seqüências, ou seja, o número de substituições por ponto entre duas seqüências foi obtida através do Modelo de Dois Parâmetros de Kimura (KTP) (Kimura Two-Parameters), com razão transição/transversão = 2, excluindo-se deleções pareadas geradas pelo alinhamento múltiplo no cálculo distâncias. Usando o mesmo modelo, foram calculadas as distâncias entre e dentro das linhagens clonais. Para verificar a consistência dos cladogramas formados, procedeu-se um “bootstrap” de 5000 replicações.

Para grupo-externo, foi escolhida a espécie *Acyrtosiphon pisum* Harris (Hemiptera:Aphididae), que é considerada a mais próxima de *M. dirhodum* (Blackman & Eastop 1984) dentre as espécies que possuem seqüências do rDNA depositadas no GenBank.

5.4 Resultados e Discussão

5.4.1 Tamanho, Composição e Diversidade do ITS2

Das 25 seqüências obtidas, somente 17 foram utilizadas para a análise da região ITS2 de *M. dirhodum* devido à qualidade obtida no seqüenciamento. Uma seqüência de 233pb (posição 48 a 280) do ITS2 de *A. pisum* (acesso n° S50426, no GenBank) foi escolhida para servir como grupo-externo. O tamanho das seqüências homólogas e parciais

do ITS2 variou de 236 a 243 pb (Tabela 5.2), como consequência de eventos de inserções e deleções (indels). A exclusão de dados perdidos em ambas as extremidades do alinhamento e regiões com alinhamento ambíguo resultaram em 250 posições (Figura 5.2). Destas, 26 foram variáveis, constituídas por 21 indels e 6 substituições, das quais três são substituições e três são deleções, sendo que na posição 221 do alinhamento múltiplo ocorre uma substituição e uma deleção.

Estes resultados demonstram que indels são muito mais comuns que substituições em ITS2 de *M. dirhodum*. No piolho humano (*P. humanus*), Leo & Barker (2002) relatam a ocorrência de grandes deleções (10 – 25 bp). Embora se tratando de outro espaçador, Fenton *et al.* (1998) encontraram uma variação intraindividual do ITS1 em *M. persicae* em que a ocorrência de indels foi comparativamente menor que a obtida com *M. dirhodum* neste trabalho.

A composição de nucleotídeos revela a predominância de CG, com aproximadamente 70% da composição nucleotídica do ITS2 (Tabela 5.2). Segundo Torres *et al.* (1991), a predominância de CG sobre AT em ITS é a mais comum. Uma exceção é a predominância de AT em ITS de *Drosophila* (Schlotterer *et al.* 1994). Comparando-se com outras seqüências de afídeos depositadas no GenBank, observou-se que a predominância de GC sobre AT é uma regra geral para este grupo. Esta comparação também mostrou que a maior similaridade (mais baixos valores de E-value) obtida no procedimento BLASTn no site NCBI – National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foi com a seqüência do DNA ribossomal de *M. dirhodum*, acesso AF487714. A seguir, as maiores similiaridades foram com seqüências de DNA ribossomal de *A. pisum*.

A diversidade média de nucleotídeos na região ITS2 dentro das linhagens clonais foi muito similar à diversidade encontrada entre as linhagens clonais (Tabela 5.3). Dentro das linhagens clonais previamente caracterizadas por RAPD, o valor mais baixo de diversidade de nucleotídeos

foi encontrado na linhagem T-IJ-2 ($\pi_i = 1,3 \%$), e o mais alto foi encontrado na linhagem A-SEL-1 ($\pi_i = 3,3\%$).

Entre as linhagens clonais, os maiores valores de π foram obtidos nos pares de seqüências que continham a linhagem A-SEL-1. Em especial, o par A-PAN-3-B e A-SEL-1 A é o que possui maior diversidade de nucleotídeos entre si ($\pi = 5,0 \%$). A maior taxa de substituição (1,6 %), foi encontrada entre os pares formados pela seqüência de A-SEL1-A com as seqüências da linhagem T-MEX-1 (T-MEX-1-A e T-MEX-1-B), que diferem entre si pela ocorrência de quatro substituições.

Esses resultados demonstram que a diversidade de nucleotídeos do ITS2 de *M. dirhodum* se distribui de modo homogêneo tanto dentro (π_i) quanto entre as linhagens clonais (π_c), o que é concordante com os resultados obtidos por Gandolfi *et al.* (2001) para *D. stevensoni* (Crustacea: Ostracoda). Por outro lado, apesar de haver variação dentro de um mesmo indivíduo em ácaros do gênero *Ixodes*, Risch *et al.* (1997) encontrou valor de diversidade de nucleotídeos intra-individual menor que entre populações (conjuntos de indivíduos de mesma localização geográfica).

Variações intra-individuais em ITS1 e ITS2 podem ocorrer através de simples erros de incorporação de nucleotídeos na reação de PCR ou de seqüenciamento (Fenton *et al.* 1997, Leo & Barker 2002). Schlotterer & Tautz (1991) demonstraram que o erro mais comum é o aumento na extensão das seqüências repetidas de um único nucleotídeo. A ocorrência de indels simultaneamente em duas ou mais seqüências na mesma região do ITS2 de *M. dirhodum* demonstra que é altamente improvável que o polimorfismo detectado seja resultante de erros em PCR ou seqüenciamento.

Varição interna em seqüências de ITS1 foi detectada em mosquitos do gênero *Anopheles* (Wesson *et al.* 1992, Onaibe & Conn 1999), em *Cincidela dorsalis* (Coleoptera: Cincidellidae) (Vogler & DeSalle 1994) e em ácaros do gênero *Ixodes* (Risch *et al.* 1997). A quantidade de posições variáveis encontradas no ITS2 em *M. dirhodum* (10,4%) é menor que a ocorrente (34,4 %) no ITS2 de *P. humanus* (Leo & Barker 2002). O resultado obtido

na variação interna do ITS2 das linhagens clonais analisadas neste trabalho é mais similar ao obtido por Risch *et al.* (1997) para *Ixodes scapularis* (Acari). O único trabalho relatando a variação do ITS em afídeos é o de Fenton *et al.* (1998), que revela a existência de seis mutações de ponto no ITS1 de *M. persicae*, que caracterizam diferentes haplótipos na espécie. A taxa de substituição encontrada por esses autores é semelhante à obtida no ITS2 de *M. dirhodum*.

Em organismos partenogenéticos, como afídeos, a ausência de meiose limita a formação de moléculas heteroduplex que são necessárias para uma homogeneização das cópias parálogas (cópias que surgem antes do processo de especiação). Apesar desses organismos servirem de modelo para estudos usando-se técnicas de biologia molecular, a evolução em concerto de cópias do DNA ribossomal não tem sido investigada de forma suficiente (Gandolfi *et al.* 1998).

Tabela 5.2. Composição de nucleotídeos (em % de A,T,C,G) e tamanho (pares de bases) das seqüências de ITS2 de *Metopolophium dirhodum*.

Código da sequência	Conteúdo de T(%)	Conteúdo de C(%)	Conteúdo de A(%)	Conteúdo de G(%)	Tamanho (pb)
T-CAL-1-A	16,3	33,9	15,1	34,7	238
T-CAL-1-B	15,6	34,6	15,2	34,6	237
T-IJ-2-A	15,9	34,3	15,1	34,7	239
T-IJ-2-B	15,5	34,3	15,1	35,1	239
T-IJ-2-C	16,3	34,3	15,1	34,3	239
A-PAN-3-A	16,1	33,9	15,3	34,7	236
A-PAN-3-B	16,6	34,0	14,9	34,4	241
A-PAN-3-C	15,8	34,2	15,0	35,0	240
A-PAN-3-D	15,5	34,3	15,1	35,1	239
A-SEL-1-A	16,9	34,2	14,8	34,2	243

A-SEL-1-B	16,0	34,2	14,8	35,0	243
A-SEL-1-C	16,0	34,5	15,1	34,5	238
T-MEX-1-A	15,3	33,9	15,3	35,6	236
T-MEX-1-B	15,5	33,9	15,1	35,6	239
T-MEX-1-C	15,8	34,2	15,0	35,0	240
T-MEX-1-D	16,2	34,0	14,9	34,9	241
T-MEX-1-E	16,7	34,2	14,6	34,6	240

Figura 5.2 Alinhamento múltiplo das seqüências parciais ITS2 de *Metopolophium dirhodum* com a região homóloga de *Acyrtosiphon pisum* (acesso S50426 no GenBank). Substituições são indicadas em negrito sublinhado.

	5	15	25	35	45	55
T-CAL-1-A	GCCCGCT-CG	TCGG-CCGCT	TCTGGTGGTG	CGAGATTG <u>TC</u>	GG-TTCGACC	-GAGGAAAAC
T-CAL-1-B	GCCCGCT-CG	TCGG-CCGCT	-CTGGTGGTG	CGAGATTGGC	GG-TTCGACC	-GAGGAAAAC
T-IJ-2-A	GCCCGCT-CG	TCGG-CCGCT	-CTGGTGGTG	CGAGATTGGC	GG-TTCGACC	-GAGGAAAAC
T-IJ-2-B	GCCCGCT-CG	TCGG-CCGCT	-CTGGTGGTG	CGAGATTGGC	GG-TTCGACC	-GAGGAAAAC
T-IJ-2-C	GCCCGCTTCG	TCG--CCGCT	TCTGGTGGTG	CGAGATTGGC	GG-TTCGACC	-GAGGAAAAC
A-PAN-3-A	GCCCGCT-CG	TCGG-CCGCT	TCTGGTGGTG	CGAGATTGGC	GG-TTCGACC	-GAGGAAAAC
A-PAN-3-B	GCCCGCTTCG	TCGGGCCGCT	-CTGGTGGTG	CGAGATTGGC	GG-TTCGACC	-GAGGAAAAC
A-PAN-3-C	GCCCGCTTCG	TCGG-CCGCT	-CTGGTGGTG	CGAGATTGGC	GG-TTCGACC	-GAGGAAAAC
A-PAN-3-D	GCCCGCT-CG	TCGG-CCGCT	-CTGGTGGTG	CGAGATTGGC	GG-TTCGACC	-GAGGAAAAC
A-SEL-1-A	GCCCGCTTCG	TCGG-CCGCT	TCTGGTGGTG	CGAGATTGGC	GG-TTCGACC	CGAGGAAAAC
A-SEL-1-B	GCCCGCT-CG	TCGG-CCGCT	TCTGGTGGTG	CGAGATTGGC	GG-TTCGACC	-GAGGAAAAC
A-SEL-1-C	GCCCGCTTCG	TCG--CCGCT	-CTGGTGGTG	CGAGATTGGC	GG-TTCGACC	-GAGGAAAAC
T-MEX-1-A	GCCCGCT-CG	TCGG-CCGCT	-CTGGTGGTG	CGAGA <u>A</u> TGGC	GG-TTCGACC	-GAGGAAAAC
T-MEX-1-B	GCCCGCT-CG	TCGG-CCGCT	-CTGGTGGTG	CGAGA <u>A</u> TGGC	GG-TTCGACC	-GAGGAAAAC
T-MEX-1-C	GCCCGCT-CG	TCGG-CCGCT	-CTGGTGGTG	CGAGATTGGC	GG-TTCGACC	-GAGGAAAAC
T-MEX-1-D	GCCCGCTTCG	TCGG-CCGCT	TCTGGTGGTG	CGAGATTGGC	GG-TTCGACC	-GAGGAAAAC
T-MEX-1-E	GCCCGCTTCG	TCGG-CCGCT	TCTGGTGGTG	CGAGATTGGC	GGCTT-GACC	-GAGGAAAAC
A. <i>pisum</i>	GCACGCC-CG	TCG--CCGCT	-CCGGTGGTG	CGAGATTGGC	GG-TTCGACC	-GGGGAGAGC

	65	75	85	95	105	115
T-CAL-1-A	CGCT-GCGCG	GCCGCCTCCG	GTCGTCCGCC	CAAGTTGCGA	TGGAAAACAG	TCACGGGTTC
T-CAL-1-B	CGCT-GCGC-	GCCGCCTCCG	GTCGTCCGCC	CAAGTTGCGA	TGGAAAACAG	TCACGGGTTC

T-IJ-1-A	CGCT-GCGCG	GCCGCCTCCG	GTCGTCCGCC	CAAGTTGCGA	TGGAAAACAG	TCACGGGTTC
T-IJ-1-B	CGCT-GCGCG	GCCGCCTCCG	GTCGTCCGCC	CAAGTTGCGA	TGGAAAACAG	TCACGGGTTC
T-IJ-1-C	CGCT-GCGCG	GCCGCCTCCG	GTCGTCCGCC	CAAGTTGCGA	TGGAAAACAG	TCACGG-TTC
A-PAN-1-A	-GCT-GCGC-	GCCGC-TCCG	GTCGTCCGCC	CAAGTTGCGA	TGGAAAACAG	TCACGGGTTC
A-PAN-1-B	CGCT-GCGC-	GCCGC-TCCG	GTCGTCCGCC	CAAGTTGCGA	TGGAAAACAG	TCACGGGTTC
A-PAN-1-C	CGCT-GCGCG	GCCGCCTCCG	GTCGTCCGCC	CAAGTTGCGA	TGGAAAACAG	TCACGGGTTC
A-PAN-1-D	CGCT-GCGCG	GCCGCCTCCG	GTCGTCCGCC	CAAGTTGCGA	TGGAAAACAG	TCACGGGTTC
A-SEL-1-A	CGCTTGCGCG	GCCGCCTCCG	GTCGTCCGCC	CAAGTTGCGA	TGGAAAACAG	TCACGGGTTC
A-SEL-1-B	CGCTTGCGCG	GCCGCCTCCG	GTCGTCCGCC	CAAGTTGCGA	TGGAAAACAG	TCACGGGTTC
A-SEL-1-C	CGCT-GCGC-	GCCGCCTCCG	GTCGTCCGCC	CAAGTTGCGA	TGGAAAACAG	TCACGGGTTC
T-MEX-1-A	CGCT-GCG--	GCCGCCTCCG	GTCGTCCGCC	CAAGTTGCGA	TGGAAAACAG	TCACGGGTTC
T-MEX-1-B	CGCT-GCGCG	GCCGCCTCCG	GTCGTCCGCC	CAAGTTGCGA	TGGAAAACAG	TCACGGGTTC
T-MEX-1-C	CGCT-GCGCG	GCCGCCTCCG	GTCGTCCGCC	CAAGTTGCGA	TGGAAAACAG	TCACGGGTTC
T-MEX-1-D	CGCT-GCGCG	GCCGCCTCCG	GTCGTCCGCC	CAAGTTGCGA	TGGAAAACAG	TCACGGGTTC
T-MEX-1-E	CGCT-GCGCG	GCCGCCTCCG	GTCGTCCGCC	CAAGTTGCGA	TGGAAAACAG	TCACGG-TTC
A. <i>pisum</i>	CGCTCGCGTC	GCCGCCTCCG	GTCGTCCGCC	CAAGTTGTGA	CGGCAAACAG	TCACGGGTTC

Figura 5.2 Continuação...

Continua

	125	135	145	155	165	175
T-CAL-1-A	TCGCGTCGTC	AAACGGCACG	TCCCCGTCCA	CCCGCCGTGC	G-AGAT-CGC	GGCCGGGTTCG
T-CAL-1-B	TCGCGTCGTC	AAACGGCACG	TCCCCGTCCA	CCCGCCGTGC	G-AGAT-CGC	GGCCGGGTTCG
T-IJ-1-A	TCGCGTCGTC	AAACGGCACG	TCCCCGTCCA	CCCGCCGTGC	G-AGAT-CGC	GGCCGGGTTCG
T-IJ-1-B	TCGCGTCGTC	AAACGGCACG	TCCCCGTCCA	CCCGCCGTGC	G-AGAT-CGC	GGCCGGGTTCG
T-IJ-1-C	TCGCGTCGTC	AAACGGCACG	TCCCCGTCCA	CCCGCCGTGC	G-AGAT-CGC	GGCCGGGTTCG
A-PAN-1-A	TCGCGTCGTC	AAACGGCACG	TCCCCGTCCA	CCCGCCGTGC	G-AGAT-CGC	GGCCGGGTTCG
A-PAN-1-B	TCGCGTCGTC	AAACGGCACG	TCCCCGTCCA	CCCGCCGTGC	G-AGAT-CGC	GGCCGGGTTCG
A-PAN-1-C	TCGCGTCGTC	AAACGGCACG	TCCCCGTCCA	CCCGCCGTGC	G-AGAT-CGC	GGCCGGGTTCG
A-PAN-1-D	TCGCGTCGTC	AAACGGCACG	TCCCCGTCCA	CCCGCCGTGC	G-AGAT-CGC	GGCCGGGTTCG
A-SEL-1-A	TCGCGTCGTC	AAACG-CACG	TCCCCGTCCA	CCCGCCGTGC	G-AGATTTCG	GGCCGGGTTC <u>CA</u>
A-SEL-1-B	TCGCGTCGTC	AAACGGCACG	TCCCCGTCCA	CCCGCCGTGC	GGAGAT-CGC	GGCCGGGTTCG
A-SEL-1-C	TCGCGTCGTC	AAACGGCACG	TCCCCGTCCA	CCCGCCGTGC	G-AGAT-CGC	GGCCGGGTTCG
T-MEX-1-A	TCGCGTCGTC	AAACGGCACG	TCCCCGTCCA	CCCGCCGTGC	G-AGAT-CGC	GGCCGGGTTCG
T-MEX-1-B	TCGCGTCGTC	AAACGGCACG	TCCCCGTCCA	CCCGCCGTGC	G-AGATTTCG	GGCCGGGTTCG
T-MEX-1-C	TCGCGTCGTC	AAACGGCACG	TCCCCGTCCA	CCCGCCGTGC	G-AGATTTCG	GGCCGGGTTCG
T-MEX-1-D	TCGCGTCGTC	AAACGGCACG	TCCCCGTCCA	CCCGCCGTGC	G-AGAT-CGC	GGCCGGGTTCG
T-MEX-1-E	TCGCGTCGTC	AAACGGCACG	TCCCCGTCCA	CCCGCCGTGC	G-AGATTTCG	GGCCGGGTTCG
A. <i>pisum</i>	TCGCGTCGTC	AAACGGCACG	TCCCCGTCCG	CCCGCCGCGC	G-AGA-----	GGCCGGGCGG

	185	195	205	215	225	235
T-CAL-1-A	ACGAGAGT-C	CACGAGACCT	CTTCGGCTT-	CCGAGACGCG	GA-GCGGACG	GTC-ACCGTA
T-CAL-1-B	ACGAGAGT-C	CACGAGACCT	CTTCGGCTT-	CCGAGACGCG	-ACGCGGACG	GTC-ACCGTA
T-IJ-1-A	ACGAGAGT-C	CACGAGACCT	CTTCGGCTT-	CCGAGACGCG	<u>T</u> ACGCGGACG	GTC-ACCGTA
T-IJ-1-B	ACGAGAGT-C	CACGAGACCT	CTTCGGCTT-	CCGAGACGCG	GACGCGGACG	GTC-ACCGTA
T-IJ-1-C	ACGAGAGT-C	CACGAGACCT	CTTCGGCTT-	CCGAGACGCG	GACGCGGACG	GTC-ACCGTA
A-PAN-1-A	ACGAGAGT-C	CACGAGACCT	CTTCGGCTT-	CCGAGACGCG	-ACGCGGACG	GTC-ACCGTA
A-PAN-1-B	ACGAGAGTTC	CACGAGACCT	CTTCGGCTTT	CCGAGACGCG	GACGCGGAC <u>C</u>	GTC-ACCGTA
A-PAN-1-C	ACGAGAGT-C	CACGAGACCT	CTTCGGCTT-	CCGAGACGCG	GACGCGGACG	GTC-ACCGTA
A-PAN-1-D	ACGAGAGT-C	CACGAGACCT	CTTCGGCTT-	CCGAGACGCG	GACGCGGACG	GTC-ACCGTA
A-SEL-1-A	<u>G</u> CGAGAGT-C	CACGAGACCT	CTTCGGCTT-	CCGAGACGCG	GACGCGGACG	GTC-ACCGTA
A-SEL-1-B	ACGAGAGT-C	CACGAGACCT	CTTCGGCTT-	CCGAGACGCG	GACGCGGACG	GTC-ACCGTA
A-SEL-1-C	ACGAGAGT-C	CACGAGACCT	CTTCGGCTT-	CCGAGACGCG	GACGCGGACG	GTC-ACCGTA
T-MEX-1-A	ACGAG <u>GG</u> T-C	CAGGAGACCT	CTTCGGCTT-	CCGAGACGCG	-ACGCGGACG	GTC-ACCGTA
T-MEX-1-B	ACGAG <u>GG</u> T-C	CAGGAGACCT	CTTCGGCTT-	CCGAGACGCG	-ACGCGGACG	GTC-ACCGTA
T-MEX-1-C	ACGAGAGT-C	CACGAGACCT	CTTCGGCTT-	CCGAGACGCG	GACGCGGACG	GTC-ACCGTA
T-MEX-1-D	ACGAGAGT-C	CACGAGACCT	CTTCGGCTT-	CCGAGACGCG	GACGCGGACG	GTC-ACCGTA

T-MEX-1-E	ACGAGAGT-C CACG-GACCT CTTCGGCTT- CCGAGACGCG GACGCGGACG GTC-ACCGTA
<i>A. pisum</i>	CTGAGAGT-C CACGAGACCT CTCCGGCTT- CCGAGAAGCG GACGCGG-CG GTC-ACCG-A

	245
T-CAL-1-A	TGGGCGGGCG
T-CAL-1-B	TGGGCGGGCG
T-IJ-1-A	TGGGCGGGCG
T-IJ-1-B	TGGGCGGGCG
T-IJ-1-C	TGGGCGGGCG
A-PAN-1-A	TGGGCGGGCG
A-PAN-1-B	TGGGCGGGCG
A-PAN-1-C	TGGGCGGGCG
A-PAN-1-D	TGGGCGGGCG
A-SEL-1-A	TGGGCGGGCG
A-SEL-1-B	TGGGCGGGCG
A-SEL-1-C	TGGGCGGGCG
T-MEX-1-A	TGGGCGGGCG
T-MEX-1-B	TGGGCGGGCG
T-MEX-1-C	TGGGCGGGCG
T-MEX-1-D	TGGGCGGGCG
T-MEX-1-E	TGGGCGGGCG
<i>A. pisum</i>	TCGGCGGAGG

Tabela 5.3. Diversidade de nucleotídeos (em %) das seqüências parciais de ITS2 em linhagens clonais de *Metopolophium dirhodum*. π_i = diversidade de nucleotídeos dentro das linhagens clonais, π_e = diversidade entre linhas clonais; π_t = diversidade entre todas seqüências

Índices	Valores (%)
π_i	1,98
π_e	1,83
π_t	1,74

5.4.2 Análise Filogenética das Linhagens Clonais

Pela topologia obtida por NJ (Fig.5.3), rejeita-se uma hipótese de monofilia associada à planta hospedeira entre os haplótipos diferenciadas por RAPD. Por esta razão, as diferenças genéticas encontradas previamente pelo uso da técnica de RAPD não caracterizariam um caso de espécies crípticas associadas ao hospedeiro conforme descrito por Drés & Mallet (2002).

Este resultado não leva descartar a proposição de que raças hospedeiro-especialistas em *M. dirhodum* possam existir (Lopes-da-Silva & Vieira 2005 – submetido). Por meio de seqüências do DNA mitocondrial de *A. pisum*, Boulding (1997) rejeitou a hipótese de que as duas raças do afídeo (a de trevo e a de alfafa) tenham origem monofilética. Do resultado obtido com a análise filogenética de *M. dirhodum*, têm-se uma constatação similar. Qualquer ocorrência de raças hospedeiro-especialistas neste afídeo no Brasil só poderia ser resultante de um evento localizado, muito recente, causado pela seleção das plantas (principalmente as cultivadas) sobre uma população introduzida. Marcadores RAPD podem ser associados com polimorfismos de valor adaptativo (Lushai *et al.* 2002). Por esta razão,

há maior probabilidade de ser encontrada uma associação de marcadores RAPD para dar suporte a uma hipótese de diferenciação genética associada à planta hospedeira, do que com as divergências encontradas em seqüências do DNA ribossomal ou mitocondrial (Caterino 1994, Vanlerbergh-Massuti & Chavigny 1998, Boulding 1997, Fenton *et al.* 1998). De modo diferente, em *Schizaphis graminum* (Rondani), Anstead *et al.* (2002) encontraram uma grande divergência entre as seqüências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) entre biótipos. Os autores consideraram *S. graminum* como um caso de raças hospedeiro-especialistas que divergiram em consequência de uma co-evolução com plantas não-cultivadas, o que não parece ser o caso de *M. dirhodum*. Para Wilson *et al.* (2003), a espécie *S. graminum* seria mais bem caracterizado como um complexo de espécies crípticas.

Os dados da Tabelas 5.4 e 5.5 demonstram que a linhagem T-MEX-1 apresenta maiores distâncias entre suas seqüências e entre as seqüências de outras linhagens. Esta é uma situação similar à encontrada por Fenton *et al.* (1997) nas seqüências do ITS1 para o afídeo *Myzus persicae*. Em afídeos, esta divergência entre as seqüências pode ser causada não somente por falhas na homogeneização da evolução em concerto. Recentemente, vários estudos têm descrito particularidades no sistema de reprodução de afídeos que têm importantes consequências evolutivas (Simon *et al.* 2003). A divergência entre linhagens assexuais (exclusivamente partenogénicas) e sexuais poderia ser uma explicação da existência de seqüências com altas taxas de substituições no ITS2 dentro de uma mesma linha clonal de *M. dirhodum*. A geração de variabilidade genética em clones de afídeos obrigatoriamente partenogénicos não é somente causada pelo acúmulo de mutações. As linhagens exclusivamente assexuais podem produzir machos, que apenas poderão fecundar fêmeas de linhagens sexuais, gerando novas linhagens partenogénicas obrigatórias e

outras capazes de reprodução sexual (Simon *et al.* 2003). Sabendo-se que o DNA ribossomal de afídeos está concentrado nos cromossomos sexuais (cromossomos X) (Wilson *et al.* 2003), fêmeas (que são XX) oriundas do processo descrito poderão ter dois conjuntos de DNA ribossomal divergentes em função do tempo de separação entre a linhagem sexual e a partenogenética obrigatória.

Desta forma, é possível que a divergência seja devida a hibridações (cruzamentos interespecíficos) entre insetos com diferentes seqüências de ITS herdadas da linhagem paterna e da materna. No entanto, os dois únicos casos de hibridação em afídeos inferidos pela análise do DNA são o de *Sitobion avenae* x *Sitobion fragariae* (Sunnucks *et al.* 1997) e das linhagens assexuais híbridas de *Rhopalosiphum padi* (*R. padi* x espécie críptica de *Rhopalosiphum*) (Delmotte *et al.* 2003).

É altamente provável que os fenômenos descritos acima não ocorram no Brasil, embora as populações brasileiras de *M. dirhodum* possam ser originárias de regiões onde a reprodução sexual ocorra freqüentemente e existam condições que favoreçam o isolamento reprodutivo nesta espécie. Prior (1976 *apud* Blackman & Eastop 1984) relata a existência de populações de *M. dirhodum* holocíclicas monoécias na Europa, exclusivamente em gramíneas, o que favorece o isolamento reprodutivo das populações heteroécias.

Ainda não foram encontradas explicações satisfatórias sobre os mecanismos responsáveis pelas variações no DNA ribossomal dos afídeos (Mandrioli *et al.* 1999). Os resultados encontrados neste trabalho mostram que as variações encontradas no ITS2 de *M. dirhodum* não podem ser associadas à planta hospedeira.

5.4.3 Conclusões

-Existe variação nas seqüências do ITS2 de *M. dirhodum* tanto dentro como entre linhagens clonais, em níveis similares.

- A divergência encontrada entre as seqüências de ITS2 não sustentam uma hipótese que as linhagens previamente caracterizadas pelo RAPD sejam monofiléticas em função da associação com a planta hospedeira.

-Em um genoma de *M. dirhodum* pode haver mais de dois haplótipos de ITS2, que de modo relativo, podem ser bem divergentes entre si. É possível que esta divergência seja oriunda do tempo de separação entre linhagens assexuais e assexuais da mesma espécie, não sendo resultante apenas de falhas de homogeneização da evolução em concerto.

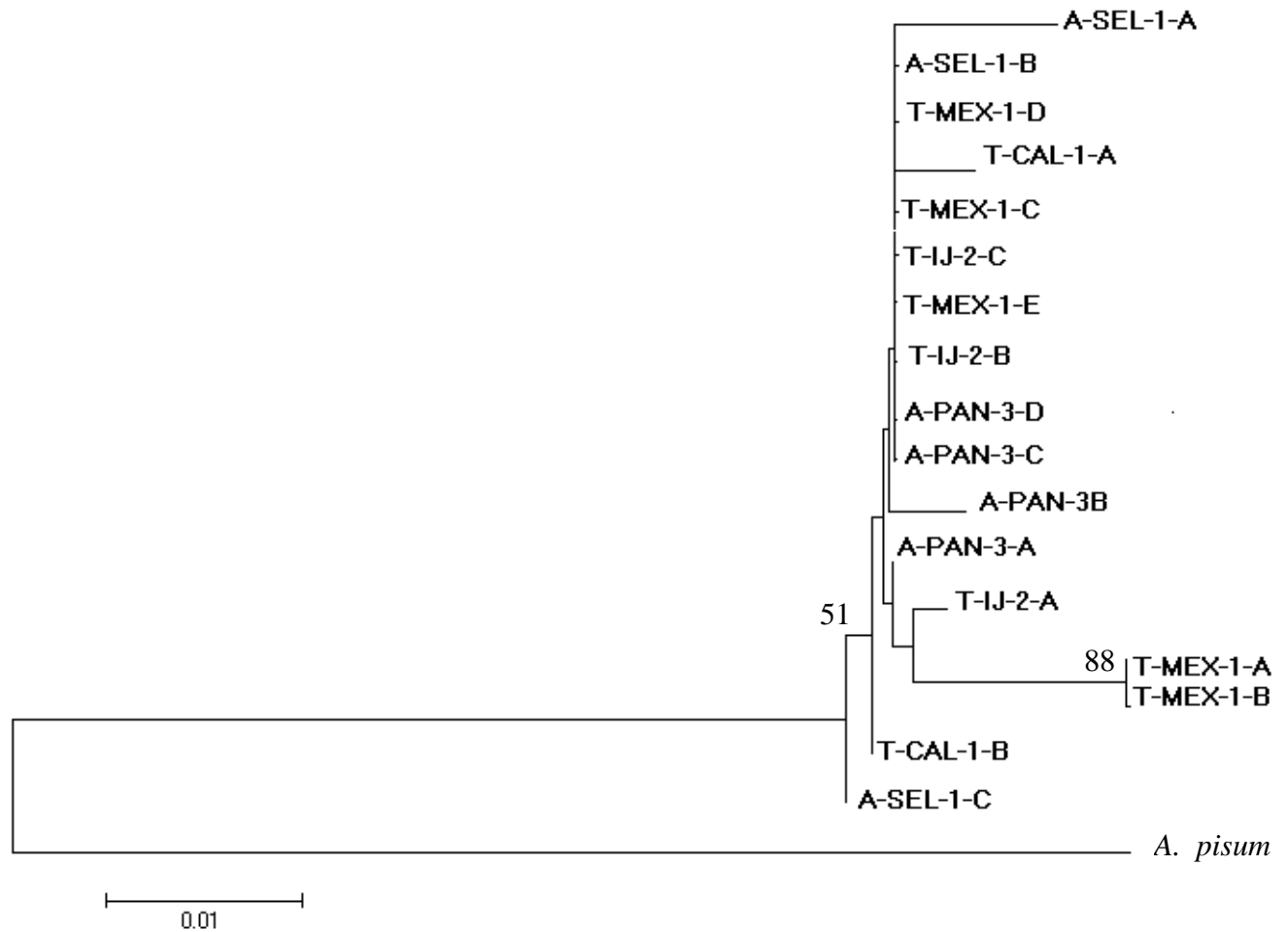


Fig. 5.3. Árvore enraizada obtida pelo método Neighbor Joining mostrando a relação filogenética entre as linhagens clonais de *Metopolophium dirhodum* inferida pela seqüência parcial do ITS2. O modelo de distância usado foi o de dois parâmetros de Kimura. Os números juntos aos dois nós representam os valores significativos de “bootstrap”. A espécie *Acyrthosiphon pisum* (acesso S04256 do GenBank) foi utilizado como grupo-externo.

Tabela 5.4. Média das distâncias entre as seqüências dentro da mesma linhagem clonal (D) de *Metopolophium dirhodum* estimada pelo Modelo de dois parâmetros de Kimura.

Linhagem Clonal	D
T-CAL-1	0,00425
T-IJ-2	0,00281
A-PAN-3	0,00212
A-SEL-1	0,00564
T-MEX-1	0,00768

Tabela 5.5. Distância média pareada entre linhagens clonais obtidas pelo modelo de dois parâmetros de Kimura.

	T-CAL-1	T-IJ-1	A-PAN-1	A-SEL-1	T-MEX-1
T-CAL-1	0,00000				
T-IJ-2	0,00282	0,00000			
A-PAN-3	0,00318	0,00211	0,00000		
A-SEL-1	0,00495	0,00423	0,00390	0,00000	
T-MEX-1	0,00725	0,00596	0,00620	0,00797	0,00000

Literatura Citada

Anstead, J.A.; J.D. Burdon & K.A. Shufran. 2002. Mitochondrial DNA sequence divergence among *Schizaphis graminum* (Hemiptera: Aphididae) clones from cultivated and non-cultivated hosts: haplotype and host associations. Bulletin of Entomological Research 92: 17-24.

Bargues, M.D.; A. Marcilla; J.M. Ramsey; J.P.Dujardin; C. J. Schofield & S. Mas-Coma. 2000. Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95(4): 567-573.

Birky, C.W. 1996. Heterozygosity, heteromorphy, and phylogenetic trees in asexual eukaryotes. *Genetics*, 144: 427-437.

Black, W.C. 1993. Variation in the ribosomal RNA cistron among host-adapted races of an aphid (*Schizaphis graminum*). *Insect Molecular Biology*. 2: 59-69.

Blackman, R. L. & V. F. Eastop. 1984. *Aphids on the World's Crops: Identification and Information Guide*. John Wiley Sons. 476p

Boulding, E.C. 1998. Molecular evidence against phylogenetically distinct host races of the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Genome* 41: 769-778.

Campbell, C.S.; M. F. Wojciechowski; B.G. Baldwin & L.A. Alice. 1997. Persistent nuclear ribosomal DNA sequence polymorphism in the *Amelanchier* agamic complex (Rosaceae) *Molecular Biology Evolution* 14: 81-90

Carvalho, A.O.C. & L.G.E. Vieira. 2001. Determinação das condições ótimas para análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel. (Hymenoptera: Formicidae) Neotropical Entomology 30: 593-600.

Caterino M.S.; C. Cho & F. A. H. Sperling. 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of Babel. Annual Review Entomology 45: 1-54.

Delmotte, F; B. Sabater-Muñoz; N. Prunier-Leterme; A. Latorre; P. Sunnucks; C. Rispe & J. C. Simon. 2003. Phylogenetic evidences for hybrid origins of asexual lineages in an aphid species. Evolution 57: 1291-1303

Douglas, L. & D. S. Haymer. 2001. Ribosomal ITS1 polymorphisms in *Ceratitis capitata* and *Ceratitis rosa* (Diptera:Tephritidae). Annals of Entomological Society of America 94: 726-731.

Dover, G. 1982. A molecular drive through evolution. BioScience 32: 526-533.

Drés, M & J. Mallet. 2002. Host races in plant feeding insects and their importance in sympatric speciation. Philosophy Transactions of Royal Society of London B 357(1420): 471-92.

Fenton, B.; G. Malloch & F. Germa. 1998. A study of variation in rDNA ITS regions shows that two haplotypes coexist within a single aphid genome. *Molecular ecology* 7: 337-344.

Fuertes-Aguilar, J.; J.A. Roselló & G. Nieto Feliner. 1999. Nuclear ribosomal DNA (nrDNA) concerted evolution in natural and artificial hybrids of *Armeria* (Plumbaginaceae). *Molecular Ecology* 8: 1341-1346.

Gandolfi, A.; P. Bonilauri; V. Rossi & P. Menozzi. 2001. Intraindividual and intraspecies variability of ITS1 sequences in the ancient asexual *Darwinula stevensoni* (Crustacea: Ostracoda). *Heredity*

Gerbi, S. A. 1985. Evolution of ribosomal DNA. In: MacIntyre, R.J. (ed.), *Molecular Evolutionary Genetics* p. 419-517

Harris, D.J. & K.A. Crandall, 2000. Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): implications for phylogenetic and microsatellite studies. *Molecular Biology Evolution* 17: 284-291.

Hillis, D. M. & M. T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA : molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology* 66: 411-453.

Kumar, S; K. Tamura; I.B. Jakobsen & M. Nei. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary genetics analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.

Lanfranco, L.; M. Delpero & P. Bonfante. 1999. Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Molecular Ecology* 8: 37-45.

Leo, N. P. & S.C. Baker. 2002. Intragenomic variation in ITS2 rDNA in the louse of humans, *Pediculus humanus*: ITS2 is not a suitable marker for population studies in this species.

Li, W.H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer, Massachusetts, 485 p.

Liao, D. Concerted evolution: molecular mechanisms and biological implication. 1999. *American Journal of Genetics* 64: 24-30.

Lushai, G.; O. Markovitch & H.D. Loxdale. 2002. Host-based genotype variation in insect revisited. *Bulletin of Entomological Research*. 92: 159-164.

Mandrioli, M.; G. C. Manicardi; D. Bizzaro & U. Bianchi. 1999. NOR heteromorphism within a parthenogenetic lineage of the aphid *Megoura viciae*. *Chromosome Research* 7: 157-162.

McLain, D. K.; D.M. Wesson; F.H. Collins & J.H. Oliver. 1995. Evolution of rDNA spacer, ITS2, in the ticks *Ixodes scapularis* and *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Heredity* 75: 303-319.

Moran, N.A.; M. A. Munson; P. Baumann & H. Ishikawa. 1993. A molecular clock in endosymbionts in insects *BioScience* 48: 295-304.

Mukabayre, O.; J. Caridi; X. Wang; Y. T. Toure; M. Coluzzi & N. J. Besansky. 2001. Patterns of rDNA sequence variation in chromosomally recognized taxa of *Anopheles gambiae*: evidence from rDNA and single copy-loci. *Insect Molecular Biology* 10: 33-46.

Nei, M. & W.S. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA* 76: 5269-5273

Onaibe, D. Y & J. Conn. 1999. Intragenomic heterogeneity of a ribosomal DNA spacer (ITS2) varies regionally in the neotropical malaria vector *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) . *Insect Molecular Biology* 8: 435-442.

Porter, C. H. & F. H. Collins. 1991. Species diagnostics differences in a ribosomal DNA transcribed spacer for sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsii* (Diptera: Culicidae) *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 45: 271-279.

Risch, S. M.; B. M. Rosenthal; S. R. Telford; A. Spielman; D. L. Hartl & F.J. Ayala. 1997. Heterogeneity of the internal transcribed spacer (ITS-2) region within individual deer ticks. *Insect Molecular Biology* 8: 123-129.

Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

Sambrook, J.; E. F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Schlotterer, C & D. Tautz. 1991. Slippage synthesis of a simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* 20: 211-215.

Schlotterer, C.; M.T. Hauser; A.Huesler & D. Tautz.1994. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution* 11(3): 513-522.

Simon J.C.; F. Delmotte; C. Rispe & T. Crease. 2003. Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: the possible routes to parthenogenesis in animals. *Biological Journal of the Linnean Society* 79, 151-163.

Sunnucks, P; P.J. De Barro; G. Lushai; N. McLean & D. Hales. 1997. Genetic structure of an aphid studied using microsatellites: cyclic parthenogenesis, differentiated lineages and host specialization. *Molecular Ecology* 6: 1059-1073.

Torres R.A.; M. Ganal; V. Hemleben . 1990. GC balance in the internal transcribed spacers ITS 1 and ITS 2 of nuclear ribosomal RNA genes. *Journal of Molecular Evolution* 30(2):170-181.

Vanlerbergh-Massuti, F. & P. Chavigny. 1994. Host-based genetic differentiation in the aphid *Aphis gossypii* Glover, evidenced from RAPD fingerprints. *Molecular Ecology* 7:905-914.

Vogler, A. P. & R. DeSalle. 1994. Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle *Cincidela dorsalis* . *Molecular Biology Evolution* 11: 393-405.

Wesson, D. M.; C. H. Porter & F. H. Collins. 1992. Sequences and secondary structure comparisons of ITS rDNA mosquitos (Diptera: Culicidae. *Molecular Phylogenetic Evolution* 1: 253-269

White, T.J.; T. Bruns,; S. Lee & J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In: Innis, M.A.; D. H. Gelfand., J. J. Sninsky & T.J White (ed.). *PCR protocols: a Guide to Methods and Applications*, Academic Press, London.

Wilson, A.C.C.; P. Sunnucks & D. F. Hales. 2003. Heritable genetic variation and potential for adaptive evolution in asexual aphids (Aphidoidea). *Biological Journal of the Linnean Society* 79: 115-135.

